

Aus dem Institut für Immunologie
Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus
TU Dresden
Direktor: Prof. Dr. med. Axel Roers

Akkumulation infiltrierender 6-sulfo LacNAc⁺ dendritischer Zellen im Kolonkarzinom

Dissertationsschrift

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus

der Technischen Universität Dresden

von

Elisabeth Geyer

geboren am 29. Juli 1991 in Dresden

Dresden, 2016

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der mündlichen Prüfung:

gez.:

Vorsitzender der Promotionskommission

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung	1
1.1 Das humane Immunsystem	1
1.2 Dendritische Zellen	2
1.2.1 Phänotyp und Funktion dendritischer Zellen.....	3
1.2.2 Aktivierung von T-Lymphozyten durch dendritische Zellen.....	4
1.2.3 Subpopulationen humaner dendritischer Zellen.....	6
1.3 Interaktion von Immunsystem und Tumor	8
1.4 Infiltration von Tumoren durch Immunzellen	10
1.5 Kolonkarzinome	11
1.5.1 Entwicklung, Charakteristika und Klassifikation kolorektaler Karzinome	12
1.5.2 Therapieansätze des Kolonkarzinoms.....	14
1.6 Zielstellung	17
2 Material und Methoden.....	19
2.1 Material.....	19
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	19
2.1.2 Lösungen und Puffer.....	19
2.1.3 Testkitsysteme	19
2.1.4 Antikörper zur Detektion von Oberflächenmolekülen	20
2.1.5 Seren	20
2.1.6 Geräte	21
2.1.7 Sonstige Materialien.....	21
2.1.8 Gewebeproben.....	21
2.2 Methoden.....	23
2.2.1 Vorbereitung der Gewebeproben zur Immunmarkierung	23

2.2.2	Immunhistochemischer Nachweis von slanDCs und pDCs in Kolonkarzinom-Geweben und tumorfreien Kolon-Geweben.....	24
2.2.3	Untersuchung der Zytokinexpression von slanDCs in Kolonkarzinom-Geweben und tumorfreien Kolon-Geweben mit Fluoreszenzfärbungen.....	25
2.2.4	Nachweis der Expression von CD83 durch slanDCs in Kolonkarzinom-Geweben mit einer Fluoreszenzfärbung.....	26
2.2.5	Analyse einer Kolokalisation von slanDCs und CD3 ⁺ T-Lymphozyten in Kolonkarzinom-Geweben.....	26
2.2.6	Detektion von slanDCs in tertiären lymphoiden Strukturen von Kolonkarzinom-Geweben.....	26
2.2.7	Nachweis der Expression von CD83 und Interleukin-23 durch slanDCs in TLS von Kolonkarzinom-Geweben.....	28
2.2.8	Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von slanDCs und pDCs in Kolonkarzinom-Geweben und in tumorfreien Kolon-Geweben.....	29
2.2.9	Statistik.....	30
3	Ergebnisse.....	31
3.1	Nachweis von slanDCs in Kolonkarzinom-Geweben.....	31
3.2	Assoziation der ermittelten Frequenz infiltrierender slanDCs mit der TNM-Klassifikation des Kolonkarzinoms.....	37
3.3	Nachweis von pDCs in Kolonkarzinom-Geweben.....	39
3.4	Expression von CD83 durch slanDCs in Kolonkarzinom-Geweben.....	42
3.5	Expression von Interleukin-23 durch slanDCs in Kolonkarzinom-Geweben.....	44
3.6	Expression von Tumornekrosefaktor- α durch slanDCs in Kolonkarzinom-Geweben..	47
3.7	Kolokalisation von slanDCs und CD3 ⁺ T-Lymphozyten in Kolonkarzinom-Geweben..	50
3.8	Detektion von slanDCs in tertiären lymphoiden Strukturen von Kolonkarzinom-Geweben.....	51
3.9	Expression von CD83 durch slanDCs in TLS von Kolonkarzinom-Geweben.....	54
3.10	Expression von IL-23 durch slanDCs in TLS von Kolonkarzinom-Geweben.....	56
4	Diskussion.....	57
4.1	DCs als zentrale Mediatoren einer Tumor-gerichteten Immunantwort.....	57
4.2	DCs als Komponente des Immunzellinfiltrats im Kolonkarzinom.....	58

4.2.1	Immunhistochemischer Nachweis von DCs in Kolonkarzinom-Geweben	58
4.2.2	Zielstrukturen eingesetzter Antikörper in immunhistochemischen Färbungen von DCs	60
4.2.3	SlanDCs als DC-Subpopulation in Kolonkarzinom-Geweben	61
4.3	Phänotyp infiltrierender slanDCs im Kolonkarzinom.....	64
4.3.1	Expression von CD83 durch slanDCs	64
4.3.2	Expression von Interleukin-23 durch slanDCs	67
4.3.3	Expression von Tumornekrosefaktor- α durch slanDCs.....	69
4.4	SlanDCs als Komponente von tertiären lymphoiden Strukturen im Kolonkarzinom	71
5	Zusammenfassung	75
6	Summary	77
7	Literaturverzeichnis.....	79
Anlage 1		91
Anlage 2		92
Danksagung		93

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Ablauf der Vorbereitung der Präparate für die immunhistochemischen Färbungen.	24
Abbildung 2:	Prinzip der Alkalischen Phosphatase- und Fluoreszenzfärbungen.	28
Abbildung 3:	Detektion von slanDCs in Kolonkarzinom-Gewebe.	33
Abbildung 4:	Immunhistochemischer Nachweis von slanDCs in tumorfreiem Kolon-Gewebe.	34
Abbildung 5:	Frequenz infiltrierender slanDCs in Kolonkarzinom-Geweben im Vergleich zu tumorfreiem Kolon-Gewebe.	34
Abbildung 6:	Assoziation der Anzahl der slanDCs in Kolonkarzinom-Geweben mit dem T-Stadium des Primärtumors.	38
Abbildung 7:	Assoziation der Anzahl der slanDCs in Kolonkarzinom-Geweben mit dem Lymphknotenstatus bei Diagnosestellung.	39
Abbildung 8:	Frequenz infiltrierender slanDCs und pDCs in Kolonkarzinom-Geweben im Vergleich.	40
Abbildung 9:	Immunhistochemischer Nachweis von pDCs in Kolonkarzinom-Gewebe.	41
Abbildung 10:	Nachweis einer CD83-exprimierenden slanDC in Kolonkarzinom-Gewebe.	43
Abbildung 11:	Prozentualer Anteil von CD83-exprimierenden slanDCs in Kolonkarzinom-Geweben.	44
Abbildung 12:	Nachweis von IL-23-exprimierenden slanDCs in Kolonkarzinom-Gewebe.	46
Abbildung 13:	Prozentualer Anteil von IL-23-exprimierenden slanDCs in Kolonkarzinom-Geweben und tumorfreien Kolon-Geweben.	46
Abbildung 14:	Prozentualer Anteil von IL-23-exprimierenden slanDCs an allen IL-23 ⁺ Zellen in Kolonkarzinom-Geweben.	47
Abbildung 15:	Nachweis einer TNF- α -exprimierenden slanDC in Kolonkarzinom-Gewebe.	48
Abbildung 16:	Prozentualer Anteil von TNF- α -exprimierenden slanDCs in Kolonkarzinom-Geweben.	49
Abbildung 17:	Vergleich der Markerexpression durch slanDCs in Kolonkarzinom-Geweben.	50
Abbildung 18:	Nachweis einer Kolo-kalisation einer slanDC und mehrerer CD3 ⁺ T-Lymphozyten in Kolonkarzinom-Gewebe.	51

Abbildung 19:	Darstellung einer tertiären lymphoiden Struktur mit slanDCs, CD3 ⁺ T-Lymphozyten und CD20 ⁺ B-Lymphozyten in einem Kolonkarzinom-Gewebe.	54
Abbildung 20:	CD83-Expression einer slanDC in der T-Zell-Zone einer TLS.	55
Abbildung 21:	IL-23-Expression einer slanDC in der T-Zell-Zone einer TLS.	56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms	15
Tabelle 2:	UICC-Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms	16
Tabelle 3:	Pathologische Charakteristika des Patientenkollektivs	22
Tabelle 4:	Verwendete Antikörper bei den immunhistochemischen Färbungen	27
Tabelle 5:	Frequenz der infiltrierenden slanDCs in den 47 untersuchten Kolonkarzinom-Gewebeproben.	35
Tabelle 6:	Frequenz der infiltrierenden slanDCs in den 38 vergleichend analysierten korrespondierenden tumorfreien Kolon-Geweben.	36
Tabelle 7:	Frequenz der infiltrierenden pDCs in den 20 untersuchten Kolonkarzinom- Gewebeproben.	41

Abkürzungsverzeichnis

ADCC	„antibody-dependent cellular cytotoxicity" (Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität)
AF	Alexa Fluor
AP	Alkalische Phosphatase
APCs	„antigen presenting cells" (antigenpräsentierende Zellen)
BDCA	„blood dendritic cell antigen" (Antigen dendritischer Zellen des Blutes)
CCR	„C-C chemokine receptor" (C-C Chemokinrezeptor)
CD	„cluster of differentiation" (Differenzierungs-Cluster)
CEA	„carcinoembryonic antigen" (karzinoembryonales Antigen)
CTLA	„cytotoxic T-lymphocyte-associated protein" (zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein)
CTLs	„cytotoxic T lymphocytes" (zytotoxische T-Lymphozyten)
DAMPs	„danger-associated molecular patterns" (Gefahren-assoziierte molekulare Muster)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCs	„dendritic cells" (dendritische Zellen)
DNA	„deoxyribonucleic acid" (Desoxyribonukleinsäure)
Fc	„fragment crystallizable" (kristallisierbares Fragment der Antikörper)
GvHD	„Graft-versus-Host-Disease" (Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion)
HEVs	Hochendotheliale Venolen
HLA	„human leukocyte antigen" (humanes Leukozytenantigen)
HMGB	„high mobility group box" (High-Mobility-Group-Protein)
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KRK	Kolorektales Karzinom
LPS	Lipopolysaccharid
mDCs	„myeloid dendritic cells" (myeloide dendritische Zellen)
MDSCs	„myeloid derived suppressor cells" (myeloide Suppressorzellen)
MHC	„major histocompatibility complex" (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MIC	„MHC class I chain-related antigen"
MSI	Mikrosatelliteninstabilität

NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NSCLC	„non-small cell lung cancer" (nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom)
PAMPs	„pathogen-associated molecular patterns" (Pathogen-assoziierte molekulare Muster)
PD	„programmed cell death" (programmierter Zelltod)
pDCs	„plasmacytoid dendritic cells" (plasmazytoide dendritische Zellen)
PRR	„pattern recognition receptor" (Mustererkennungsrezeptor)
PSGL	„P-Selectin glycoprotein ligand" (P-Selektin Glykoprotein Ligand)
slan	6-sulfo LacNAc
SLOs	Sekundäre lymphatische Organe
STAT	„Signals Transducers and Activators of Transcription"
TAMs	Tumor-assoziierte Makrophagen
TGF	„transforming growth factor" (transformierender Wachstumsfaktor)
T _H	T-Helfer-Zelle
TLR	„Toll-like receptor" (Toll-ähnlicher Rezeptor)
TLS	Tertiäre lymphoide Struktur
TNF	Tumornekrosefaktor
T _{reg}	Regulatorische T-Zelle
UICC	„Union internationale contre le cancer"
VEGF	„vascular endothelial growth factor" (endothelialer Gefäß-Wachstumsfaktor)

1 Einleitung

1.1 Das humane Immunsystem

Das menschliche Immunsystem schützt den Organismus vor Krankheitserregern wie Bakterien, Viren, Pilzen, Protozoen oder Würmern. Des Weiteren ist es in der Lage eine Immunantwort gegenüber Tumorzellen zu generieren. Haut und Schleimhäute stellen eine erste physikalische und chemische Barriere gegen eindringende Organismen dar. Pathogene, die diese Schutzmechanismen überwinden, treffen auf ein komplexes Zusammenspiel von zellulären und löslichen Komponenten, welche dem angeborenen und, im weiteren Verlauf der Infektion, dem adaptiven Immunsystem zugeordnet werden können (Abbas et al., 2012; Murphy et al., 2014).

Das angeborene Immunsystem ermöglicht eine frühe Verteidigung des menschlichen Organismus gegenüber eindringenden Pathogenen und Tumorzellen. Die Antwort erfolgt antigenunspezifisch auf evolutionär konservierte, sogenannte „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs). Hauptkomponenten stellen verschiedene Zelltypen, Plasmaproteine wie Komplementfaktoren oder Akute-Phase-Proteine und Zytokine dar. Zu den beteiligten Immunzellen gehören Phagozyten wie Granulozyten, Makrophagen und dendritische Zellen (DCs), außerdem Mastzellen und Natürliche Killer (NK)-Zellen. Eindringende Mikroorganismen werden zunächst von Phagozyten erkannt, internalisiert und anschließend abgetötet. Dabei erfolgt eine Aktivierung dieser Zellen, welche durch die Freisetzung verschiedener Lipidmediatoren, Zytokine und Chemokine weitere Phagozyten anlocken und eine lokale Blutgerinnung induzieren (Murphy et al., 2014). Zusätzlich zu ihren lokalen Effekten rufen die sezernierten Zytokine Tumornekrosefaktor (TNF)- α , Interleukin (IL)-1 β und IL-6 systemische Veränderungen hervor, beispielsweise Fieber oder die Sekretion von Akute-Phase-Proteinen durch die Leber (Abbas et al., 2012; Murphy et al., 2014). Bei einer Virusinfektion des Körpers können verschiedene Zelltypen die antiviralen Effektormoleküle Interferon (IFN)- α und IFN- β produzieren, welche die weitere Virenreplikation eindämmen und DCs, Makrophagen und NK-Zellen aktivieren (Ortaldo et al., 1983; Müller et al., 1994). NK-Zellen sind in der Lage, virusinfizierte Zellen und Tumorzellen zu erkennen und abzutöten. Zudem modulieren sie die Immunantwort durch die Produktion von Zytokinen wie IFN- γ (Vivier et al., 2008).

DCs verfügen im unreifen Zustand über eine ausgeprägte Phagozytosekapazität und sind nach Aktivierung und Ausreifung durch die Präsentation von prozessierten Peptiden auf „major histocompatibility complex“ (MHC)-Molekülen in der Lage, eine primäre T-Zell-Antwort zu

generieren (Banchereau et al., 2000; Mellman, 2013). Damit stellen sie eine entscheidende Verknüpfung zwischen dem angeborenen Immunsystem und einer adaptiven Immunantwort dar (Reis e Sousa, 2004).

Diese adaptive Immunantwort zeichnet sich durch ihre Spezifität, Diversität und Gedächtnisbildung aus. Hauptbestandteile sind verschiedene Arten von Lymphozyten und deren lösliche Produkte wie Antikörper oder Zytokine (Abbas et al., 2012; Murphy et al., 2014). Lymphozyten sind mit hochvariablen Antigenrezeptoren ausgestattet und sind solange funktionell inaktiv bis sie durch Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen aktiviert werden. Es werden „cluster of differentiation“ (CD)20⁺ B-Lymphozyten als Effektoren der humoralen Immunität von CD3⁺ T-Lymphozyten unterschieden, welche v. a. die zelluläre Immunabwehr vermitteln. B-Lymphozyten differenzieren sich nach Aktivierung zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen und T-Lymphozyten können sich zu verschiedenen Typen von T-Effektorzellen mit unterschiedlicher Funktion entwickeln. CD8⁺ zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) lysieren infizierte Zellen oder Tumorzellen u. a. über Granzyme und Perforine aus zytotoxischen Granula, CD4⁺ T-Helferzellen (T_H-Zellen) unterstützen B-Zellen und beispielsweise DCs und CTLs in ihrer Funktion und CD4⁺ regulatorische T-Lymphozyten (T_{regs}) sind in der Lage die Aktivität anderer Immunzellen zu unterdrücken (Berke, 1994; Zhu und Paul, 2008).

Als Folge einer adaptiven Immunantwort bildet sich ein immunologisches Gedächtnis auf Basis von langlebigen B- und T-Zellen aus, welche dem Organismus ermöglichen, bei erneutem Kontakt mit dem Krankheitserreger schneller und effektiver zu reagieren (Sallusto et al., 2004). Angeborene und adaptive Immunantworten stellen keine isolierten Systeme dar, sondern beeinflussen sich gegenseitig. So stimulieren und steuern Komponenten des angeborenen Immunsystems eine nachfolgende adaptive Immunantwort und diese wiederum wirkt häufig verstärkend und modulierend auf Effektoren der angeborenen Immunität.

1.2 Dendritische Zellen

DCs entwickeln sich aus hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks und entstehen zum überwiegenden Teil, ähnlich wie Monozyten und Granulozyten, aus myeloiden Vorläuferzellen (Manz et al., 2001).

Als professionelle antigenpräsentierende Zellen (APCs) sind sie besonders effizient in der Lage, naive T-Lymphozyten zu aktivieren und stellen damit das entscheidende Bindeglied zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem dar (Banchereau et al., 2000; Reis e Sousa, 2004). Zudem spielen sie eine wichtige Rolle in der Induktion und Aufrechterhaltung der zentralen und peripheren Toleranz gegenüber körpereigenen Strukturen sowie harmlosen Umweltproteinen (Steinman et al., 2003; Reis e Sousa, 2006).

1.2.1 Phänotyp und Funktion dendritischer Zellen

Grundsätzlich werden zwei verschiedene Funktionszustände von DCs unterschieden: unreife DCs mit der ausgeprägten Fähigkeit Proteine aufzunehmen und zu prozessieren und reife DCs, welche die Aktivierung von T-Lymphozyten und deren Differenzierung in Effektorzellen induzieren können (Banchereau et al., 2000; Reis e Sousa, 2006; Mellman, 2013).

Die Aufnahme von Proteinen durch unreife DCs erfolgt durch Makropinozytose, rezeptorvermittelte Endozytose und Phagozytose mittels „fragment crystallizable“ (Fc)- und Komplementrezeptoren sowie C-Typ Lektin-Rezeptoren wie dem Mannoserezeptor (Banchereau und Steinman, 1998; Banchereau et al., 2000). Entscheidend für eine effektive Erfassung der Proteine der Umgebung ist außerdem die Akkumulation von DCs an Eintrittspforten von Mikroorganismen wie z. B. der Haut oder der Mukosa des Gastrointestinal- und Respirationstrakts (Steinman und Banchereau, 2007). In der intestinalen Schleimhaut können DCs das einschichtige Epithel durchdringen und mit ihren Dendriten Bakterien im Darmlumen detektieren (Rescigno et al., 2001). Während entzündlicher Geschehen werden unreife DCs zeitnah und zahlreich aus dem Blut in die Peripherie rekrutiert (Sabatté et al., 2007). Die prozessierten Peptide werden auf MHC-Proteinen an der Zelloberfläche präsentiert und können so antigenspezifischen T-Zellen dargeboten werden. Die meisten Zelltypen sind in der Lage, CD8⁺ T-Lymphozyten Peptide auf MHC-Klasse-I-Molekülen zu präsentieren. Diese leiten sich von zytosolischen Proteinen ab, die zunächst proteasomal degradiert und anschließend im endoplasmatischen Retikulum an MHC-Klasse-I-Moleküle gebunden werden. Nach ihrem Transport an die Zelloberfläche können dadurch z. B. virale Peptide oder Peptide von Tumorantigenen von CTLs erkannt und die betroffenen Zellen eliminiert werden. Professionelle APCs nehmen zudem extrazelluläre Proteine wie Bestandteile virusinfizierter Zellen oder Tumorzellen auf, welche dann in Phago- oder Endolysosomen vorliegen, in Peptide degradiert und an MHC-Klasse-II-Moleküle gebunden werden. Diese Peptid-MHC-Komplexe können anschließend CD4⁺ T-Lymphozyten präsentiert werden. Bestimmte DC-Subpopulationen sind zusätzlich in der Lage, Peptide von internalisiertem extrazellulärem Material auf MHC-Klasse-I-Molekülen zu präsentieren. Durch diese sogenannte Kreuzpräsentation von Antigenen kann eine CTL-Antwort auch dann generiert werden, wenn die DCs nicht selbst infiziert sind (Jensen, 2007; Joffre et al., 2012).

Unreife DCs sind in der Lage, evolutionär konservierte Strukturen von Pathogenen, die PAMPs, mittels sogenannter „pattern recognition receptors“ (PRRs) zu erfassen. Zu diesen Rezeptoren zählen v. a. die auf der Zelloberfläche oder in intrazellulären Vesikeln lokalisierten Toll-like Rezeptoren (TLRs), welche auf die Detektion von mikrobiellen Proteinen, Lipiden, Nukleinsäuren oder Zellwandbestandteilen gramnegativer Bakterien wie Lipopolysaccharid (LPS) spezialisiert sind und zahlreiche Rezeptoren, die an der Erkennung und Internalisierung

von Antigenen beteiligt sind. Im Zytosol befinden sich weitere Erkennungsmoleküle, sogenannte NOD-like oder RIG-1-like Rezeptoren, die mikrobielle Produkte binden können und anschließend die Signalwege induzieren, welche auch der Aktivierung der TLRs nachgeschaltet sind (Akira et al., 2006; Iwasaki und Medzhitov, 2015). In Folge entzündlichen Zelluntergangs können Adenosintriphosphat, Harnsäure, mitochondriale „deoxyribonucleic acid“ (DNA) oder das „high mobility group box“ (HMGB)1 Protein freigesetzt werden. Diese können als sogenannte „danger-associated molecular patterns“ (DAMPs) modulierend auf Phänotyp und Funktion von DCs wirken (Chen und Nunez, 2010). Eine der wichtigsten Funktionen von PRRs ist der Informationsgewinn über die Eigenschaften eines Pathogens, um die passende adaptive Immunantwort zu generieren (Iwasaki und Medzhitov, 2015). Die Bindung derartiger PAMPs bzw. DAMPs an die eben beschriebenen Rezeptoren sowie inflammatorische Zytokine führen zur Reifung und Aktivierung der DCs. Während der Ausreifung erfolgt die Expression von Migration-steuernden Chemokinrezeptoren wie dem „C-C chemokine receptor“ (CCR) 7 und eine Herunterregulierung der Antigenaufnahmemechanismen (Reis e Sousa, 2006). Die Zellen exprimieren nun u. a. Moleküle wie CD80 (B7.1), CD86 (B7.2) und CD40 auf der Oberfläche. Zudem wird die Neusynthese und Sekretion zahlreicher Zytokine und Chemokine angeregt und auf der Zelloberfläche werden vermehrt MHC-Moleküle exprimiert (Banchereau et al., 2000; Sabatté et al., 2007).

Neben ihrer bereits erwähnten Interaktion mit T-Lymphozyten spielen DCs eine Rolle im Aufbau einer B-Zell-Immunität und regulieren NK-Zellen. DCs verstärken die Aktivierung, die Proliferation, IFN- γ -Produktion und Zytotoxizität von NK-Zellen mittels zellmembranassoziierter Moleküle und Zytokine. Im Gegenzug fördern NK-Zellen die Reifung und Zytokinproduktion durch DCs und verstärken die DC-vermittelte Aktivierung von T-Lymphozyten. Insbesondere in Kombination können daher diese beiden Zellarten entscheidend an der Immunabwehr von Viren und Tumorzellen mitwirken (Moretta, 2005; Wehner et al., 2011).

1.2.2 Aktivierung von T-Lymphozyten durch dendritische Zellen

Nach erfolgreicher Migration ausgereifter DCs in sekundäre lymphatische Organe (SLOs) erfolgt die Induktion einer adaptiven Immunantwort durch die Interaktion der reifen, antigenpräsentierenden DCs mit naiven, antigenspezifischen CD3⁺ T-Lymphozyten, d. h. T-Lymphozyten ohne vorangegangenen Antigenkontakt. Erkennt der T-Zell-Rezeptor den passenden MHC-Peptid-Komplex, erfolgt die Ausbildung einer sogenannten immunologischen Synapse an der Interaktionsfläche von DC und T-Zelle. Dabei kommt es zu einer lokalen Reorganisation von Membranproteinen und zytosolischen Adapterproteinen und der

Umgestaltung des Zytoskeletts mit einer stabilen interzellulären Interaktion durch verschiedene Adhäsionsmoleküle. Den zentralen Anteil dieser Synapse bilden die T-Zell-Rezeptoren und MHC-Peptid-Komplexe (Guermónprez et al., 2002; Fooksman et al., 2010; Hivroz et al., 2012).

Die Aktivierung einer naiven T-Zelle benötigt verschiedene Signale von der DC, vermittelt über den MHC-Peptid-Komplex, kostimulatorische Moleküle und Zytokine. Das erste Signal erfolgt über die Erkennung des MHC-Peptid-Komplexes durch den T-Zell-Rezeptor. Als zweites Signal sind kostimulatorische Moleküle auf den DCs erforderlich: Reife DCs exprimieren vermehrt CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) auf ihrer Oberfläche, welche mit dem Rezeptor CD28 auf T-Lymphozyten interagieren (Acuto und Michel, 2003; Keir und Sharpe, 2005). Neben diesen klassischen Molekülen wurden weitere Liganden und Rezeptoren ähnlich CD28/B7 identifiziert: eine Interaktion verschiedener B7-Moleküle mit dem inhibitorischen „cytotoxic T-lymphocyte-associated protein“ (CTLA)-4 oder „programmed cell death“ (PD)-1 Molekül auf T-Zellen verhindert die Aktivierung von T-Lymphozyten und spielt daher eine wichtige Rolle in Toleranz- und „Tumor-Escape“-Mechanismen (Keir und Sharpe, 2005; Leung und Suh, 2014). Die Aktivierung führt zu klonaler Expansion der T-Lymphozyten, der Sekretion verschiedener Zytokine und der Differenzierung in Effektorzellen. CD4⁺ Effektor-T-Lymphozyten umfassen verschiedene Subpopulationen, welche sich durch die Zytokinsekretion und Expression von Transkriptionsfaktoren unterscheiden. Das sogenannte dritte Signal von DCs im Rahmen der T-Zell Aktivierung wird durch zahlreiche, von den DCs produzierte Zytokine vermittelt, welche die Differenzierung der T-Lymphozyten in die unterschiedlichen Effektorpopulationen steuern. IL-12 führt beispielsweise zur Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Lymphozyten in IFN- γ - und TNF- α -produzierende T_H1-Zellen und IL-1, IL-6 und IL-23 induzieren T_H17-Zellen, welche eine Entzündungsreaktion zur Bekämpfung extrazellulärer Bakterien und Pilze durch Produktion von IL-17 und IL-22 unterstützen (Reiner, 2007; Geginat et al., 2013; Walsh und Mills, 2013). Unter bestimmten Bedingungen können T_H17-Zellen Charakteristika von T_H1-Zellen erlangen und diese T_H1/T_H17 Hybriden sind in der Lage, teilweise sowohl IFN- γ als auch IL-17 zu produzieren, und spielen eine wichtige Rolle in inflammatorischen Erkrankungen (Geginat et al., 2013). Außerdem können sich naive CD4⁺ T-Lymphozyten in verschiedene Subpopulationen von T_{regs} differenzieren und so durch die Produktion der antiinflammatorischen Zytokine IL-10 oder „transforming growth factor“ (TGF)- β ungewollte Immunreaktionen verhindern und die Toleranz gegenüber körpereigenen Strukturen aufrechterhalten (Geginat et al., 2013; Walsh und Mills, 2013). Die Aktivierung von naiven CD8⁺ T-Lymphozyten und ihre Differenzierung zu CTLs erfolgt auf ähnliche Art und Weise, jedoch spielen hier häufig DCs mit Fähigkeit zur Kreuzpräsentation eine Rolle. Zudem muss

ein sogenanntes „licensing“ der DCs durch T_H-Zellen über eine CD40:CD40-Ligand-Interaktion stattfinden (Ahmed et al., 2012).

Nach erfolgreicher Abwehr der Pathogene und Elimination der Antigene fehlen wichtige Überlebenssignale für die Effektor-T-Zellen und diese gehen bis auf einige als Gedächtniszellen zurückbleibenden Lymphozyten zur Wiederherstellung der Homöostase in Apoptose (Hand und Kaech, 2009).

Nicht nur in Anwesenheit infektiöser oder inflammatorischer Stimuli, sondern auch im sogenannten „steady state“ migrieren DCs in SLOs und präsentieren körpereigene und harmlose Umweltproteine. Diese unreifen DCs stellen nur Signal 1 für die T-Zellen bereit, jedoch keine kostimulatorischen Moleküle. T-Lymphozyten, welche diese Peptide erkennen, werden im Rahmen der Aufrechterhaltung einer peripheren Toleranz von diesen tolerogenen DCs anergisiert und gehen in Apoptose. Zudem können unreife DCs eine Immunantwort durch die Induktion von T_{regs} supprimieren (Steinman et al., 2003; Powell, 2006).

1.2.3 Subpopulationen humaner dendritischer Zellen

DCs stellen keine homogene Zellgruppe dar, sondern setzen sich aus zahlreichen Subpopulationen zusammen, welche sowohl in lymphatischen als auch in nicht-lymphatischen Geweben lokalisiert sind und sich durch verschiedene Oberflächenmoleküle sowie funktionelle Eigenschaften unterscheiden. Traditionell zeichnen sich humane DCs durch eine hohe Dichte von MHC-Klasse-II-Molekülen, nämlich durch die Expression von „human leukocyte antigen“ (HLA)-DR, aus und sind durch fehlende Zellmarker von T-Lymphozyten (CD3), B-Lymphozyten (CD19), Monozyten (CD14) und NK-Zellen (CD56) charakterisiert. Im humanen Blut wird derzeit zwischen myeloiden DCs (mDCs), die auch als konventionelle oder klassische DCs bezeichnet werden, und plasmazytoiden DCs (pDCs) unterschieden (MacDonald et al., 2002; Salvador et al., 2012; Collin et al., 2013).

PDCs werden über die Oberflächenmoleküle CD123, CD303 („blood dendritic cell antigen“ (BDCA)-2) und CD304 (BDCA-4) identifiziert und weisen keine Expression von myeloiden Markern auf. Unter homöostatischen Bedingungen zirkulieren die Zellen im Blut und den SLOs. Im Rahmen von Infektionen oder Tumorerkrankungen werden sie in die entsprechenden Gewebe rekrutiert und migrieren nach Aktivierung in die drainierenden Lymphknoten. Durch die gute Erkennung von Einzelstrang-RNA (ssRNA) bzw. unmethylierten CpG-Motiven der DNA über die Expression der TLRs 7 und 9 sind sie in der Lage, große Mengen antivirales Typ-I-Interferon zu produzieren, und können zusätzlich eine antivirale T-Zell-Antwort induzieren. Aufgrund dieser funktionalen Kapazitäten kommt ihnen eine

Schlüsselrolle in der Virenabwehr zu (Siegal et al., 1999; Lande und Gilliet, 2010; Vermi et al., 2011).

MDCs exprimieren CD11c und weitere Marker, wie CD13 oder CD33, die ihre myeloide Herkunft bestätigen. Im Blut lassen sie sich in drei Subpopulationen unterteilen: CD141⁺ (BDCA-3), CD1c⁺ (BDCA-1) und CD16⁺ DCs. Die kleine Population der CD141⁺ Zellen zeichnet sich durch eine besonders gute funktionelle Kapazität zur Kreuzpräsentation von Antigenen aus. CD1c⁺ DCs lassen sich in zahlreichen Geweben nachweisen und stellen laut MacDonald et al. die potentesten Stimulatoren von T-Lymphozyten dar (MacDonald et al., 2002; Piccioli et al., 2007; Schreibelt et al., 2010; McGovern et al., 2015). Die größte Population von mDCs im Blut repräsentieren jedoch die CD16⁺ DCs, zu denen die sogenannten 6-sulfo LacNAc⁺ (slan) DCs gezählt werden (Schäkel et al., 1998; MacDonald et al., 2002; Schäkel, 2009).

SlanDCs als Vertreter der CD16⁺ mDCs wurden 1998 von Schäkel et al. zum ersten Mal mithilfe des M-DC8-Antikörpers aus dem Blut isoliert und machen ca. 0,6-2 % der peripheren mononukleären Blutzellen aus (Schäkel et al., 1998). Später erfolgte die Identifizierung des M-DC8 Epitops als 6-sulfo LacNAc, eine Kohlenhydratmodifikation des „P-Selectin glycoprotein ligand“ (PSGL)-1 (Schäkel et al., 2002). Auf ihrer Oberfläche exprimieren sie charakteristischerweise die Fc γ -Rezeptoren CD16 und CD32 und die Anaphylatoxinrezeptoren C5aR und C3aR. Die Expression des Fc γ -III-Rezeptors (CD16) durch unreife slanDCs ermöglicht ihnen die Erkennung und Internalisierung von Immunkomplexen und vermittelt zusammen mit CD32 eine effiziente Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) (Schäkel et al., 2002; Schmitz et al., 2002; Dobel et al., 2013). SlanDCs zeigen zudem direkte zytotoxische Aktivität gegenüber Tumorzellen, vornehmlich basierend auf einer TNF- α Produktion der DCs (Schmitz et al., 2005). Die Zellen besitzen ein starkes proinflammatorisches Potenzial: Bei Stimulation mit LPS übertreffen sie CD1c⁺ DCs und Monozyten in der Produktion von TNF- α . Außerdem gelten sie als die Hauptproduzenten von IL-12 in der frühen Phase der Immunantwort und induzieren so eine T_H1-Immunantwort mit IFN- γ Produktion (Schäkel et al., 2002; Schäkel et al., 2006). Zusätzlich verstärken slanDCs die Proliferation, IFN- γ -Produktion und Zytotoxizität von NK-Zellen (Wehner et al., 2009). Des Weiteren sind slanDCs potente Induktoren einer naiven CD4⁺-T-Zell-Antwort und sind in der Lage, fremdantigen- oder tumorantigenspezifische CTLs durch die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen zu generieren (Schäkel et al., 1998; Schäkel et al., 2002; Wehner et al., 2011).

SlanDCs wurden bereits in mehreren inflammatorischen Erkrankungen und im Rahmen von Tumorerkrankungen nachgewiesen. Hänsel et al. untersuchten die Zellen in der Dermis von Psoriasis-befallenen Hautarealen und zeigten, dass slanDCs im Blut CD1c⁺ DCs in der

Induktion krankheitsbestimmender T_H1/T_H17 -Zellen durch die Produktion von IL-1, IL-6 und IL-23 übertreffen (Hänsel et al., 2011). Auch in betroffenen Hautregionen im Rahmen der Autoimmunerkrankung Lupus erythematoses oder in entzündlich veränderten Darmarealen aufgrund einer „Graft-versus-Host-Disease“ (GvHD) konnte die Präsenz von Zytokin-produzierenden slanDCs gezeigt werden (Hänsel et al., 2013; Sommer et al., 2014). Vermi et al. untersuchten slanDCs in Tumoren und Lymphknotenmetastasen und detektierten eine Akkumulation dieser DCs in den tumorbefallenen Lymphknoten. Im Gewebe der Primärtumoren war es ihnen allerdings nicht möglich, slanDCs in relevanter Anzahl nachzuweisen (Vermi et al., 2014). Kürzlich gelang jedoch Toma et al. der Nachweis einer Akkumulation von slanDCs sowohl in primären Nierenzellkarzinomen als auch in deren Lymphknoten- und Fernmetastasen. Die aus frischem Tumorgewebe isolierten slanDCs wiesen einen tolerogenen Phänotyp mit fehlenden kostimulatorischen Molekülen und einer Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 auf (Toma et al., 2015).

1.3 Interaktion von Immunsystem und Tumor

Auch Tumoren stehen unter der Kontrolle des Immunsystems. Schon früh entstand die Hypothese, dass langlebige Organismen ohne das schützende Immunsystems im Laufe des Lebens zahlreiche Tumoren entwickeln würden. Später wurde die Existenz von Tumorantigenen beschrieben, welche die Induktion einer antigenspezifischen adaptiven Immunantwort gegenüber Tumorzellen ermöglichen (Schreiber et al., 2011). Jedoch hat das Immunsystem nicht nur schützende Einflüsse, sondern kann über verschiedene Mechanismen auch ein Tumorwachstum fördern. Aus diesen Beobachtungen entwickelte sich die Immunoediting-Hypothese. Dieses Immunoediting geht mit Veränderungen der Immunogenität der Tumoren einher, d. h. der Eigenschaft eine Immunantwort in einem Organismus hervorzurufen. Es werden die Phasen Eliminierung, Equilibrium und „Escape“ unterschieden, welche nicht immer alle durchlaufen werden müssen und einer Beeinflussung durch externe Faktoren unterliegen können (Kim et al., 2007; Schreiber et al., 2011).

In der Phase der Eliminierung wird die Präsenz von entstehenden Tumoren erkannt und es erfolgt eine Abtötung maligne transformierter Zellen durch ein Zusammenspiel des angeborenem und adaptiven Immunsystems, bevor die Tumoren überhaupt klinisch nachweisbar erscheinen (Kim et al., 2007; Schreiber et al., 2011). Eine effektive Tumorgerichtete Immunantwort basiert auf der Präsentation von Tumorantigenen durch DCs mit resultierender Induktion einer T-Lymphozyten-Antwort (Banchereau und Palucka, 2005; Dhodapkar et al., 2008). Das Immunsystem kann sowohl auf tumorspezifische Antigene reagieren, z. B. Produkte mutierter Genabschnitte, als auch auf körpereigene Proteine, welche in den Tumorzellen überexprimiert werden oder eine abweichende posttranslationale

Modifikation durchlaufen haben (Finn, 2008). Durch fehlende MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Oberfläche der Tumorzellen oder der Hochregulierung von Proteinen wie „MHC class I chain-related antigen“ (MIC)A/MICB, welche als Liganden für den aktivierenden NKG2D-Rezeptor auf NK-Zellen fungieren, können Tumorzellen von NK-Zellen erkannt und eine Apoptose induziert werden (Long, 2002; Trapani und Smyth, 2002). Die sterbenden Zellen oder Zellfragmente können anschließend von DCs phagozytiert und T-Lymphozyten präsentiert werden (Ferlazzo und Morandi, 2014). Zusätzlich fördern die NK-Zellen Aktivierung und Ausreifung der DCs durch die Produktion von Zytokinen wie IFN- γ (Wehner et al., 2011). Auch durch Sauerstoff- und Nährstoffmangel im Tumorzentrum oder chemotherapeutische Reagenzien sterben Tumorzellen. Zelltod ist jedoch nicht immer immunogen, d. h. stellt nicht immer die benötigten Gefahrensignale zur Aktivierung von DCs bereit, sodass eine Toleranz gegenüber Tumorzellen induziert wird. Sterbende Tumorzellen und durch invasives Wachstum geschädigtes Gewebe können DAMPs wie HMGB1, Hitzeschockproteine, Purinmetabolite oder Hyaluronsäurefragmente freisetzen, welche von Rezeptoren auf DCs erkannt werden und zu deren Ausreifung führen (Garg et al., 2014; Gamrekashvili et al., 2015). DCs sind in der Lage, Tumorantigene nicht nur auf MHC-Klasse-II-Molekülen, sondern auch auf MHC-Klasse-I-Molekülen T-Lymphozyten zu präsentieren. Diese Kreuzpräsentation ist erforderlich für die Generierung von CTLs zur antigenspezifischen Lyse von Tumorzellen (Dhodapkar et al., 2008; Palucka et al., 2011; Dudek et al., 2013). CD4⁺ T-Zellen fördern die Differenzierung und Expansion von CTLs, aktivieren Makrophagen und können zudem auch selbständig Tumorzellen abtöten (Hung et al., 1998; Quezada et al., 2010). Die Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten erfolgt in den Tumor-drainierenden Lymphknoten oder in sogenannten tertiären lymphoiden Strukturen (TLS), welche einen alternativen Ort für die Generierung einer Tumor-gerichteten Immunantwort darstellen können (Goc et al., 2013). Außerdem können die DCs die Eliminierung von Tumoren über die Unterstützung von NK-Zellen und ein eigenes tumorizides Potential durch Sekretion von TNF- α oder kontaktabhängig z. B. über FAS-FAS-Ligand-Interaktion fördern (Schmitz et al., 2005; Tel et al., 2014).

Tumorzellen, welche diese Abwehrmechanismen überleben, werden nun im sogenannten Equilibrium vom Immunsystem in einem kontrollierten Zustand gehalten. Diese Phase kann mehrere Jahrzehnte andauern bis zu einem erneuten Wachstum oder dem Auftreten von Metastasen. Resultierend aus dem andauernden Immunselektionsdruck während dieses Equilibriums können einige Tumorzellen sogenannte „Tumor-Escape“-Strategien entwickeln, mit deren Hilfe sie der Erkennung und Abwehr des Immunsystems entkommen (Kim et al., 2007; Schreiber et al., 2011). Auf Tumorzellebene kann es z. B. zu einem Verlust der Präsentation von Antigenen kommen und dadurch zu einer verminderten Erkennung der Zellen durch CTLs (Leone et al., 2013).

Eine Tumor-induzierte Immunsuppression resultiert jedoch nicht in einer allgemeinen Defizienz des Immunsystems, sondern in einer selektiven Unterdrückung von verschiedenen Komponenten der Tumor-gerichteten Immunantwort und bedient sich dabei teilweise Strategien, welche normalerweise vom Immunsystem zur Verhinderung überschießender Immunreaktionen oder zur Beendigung einer Immunantwort nach Eliminierung der Pathogene eingesetzt werden (Whiteside, 2009). So wirkt die Expression koinhibitorischer Moleküle wie PD1-L (B7-H1) auf Tumorzellen und ihre Interaktion mit dem Rezeptor PD1 inhibierend auf die Funktion von CTLs (Seliger und Quandt, 2012). Alternativ können die Tumorzellen die Ausbildung eines immunsuppressiven Mikromilieus durch Sekretion immunsuppressiver Zytokine und Enzyme wie „vascular endothelial growth factor“ (VEGF), TGF- β , IL-10 und Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) oder durch Rekrutierung immunsuppressiver Immunzellen wie T_{regs} oder „myeloid derived suppressor cells“ (MDSCs) fördern (Vesely et al., 2011). T_{regs} inhibieren Proliferation und Funktion von CTLs und MDSCs können ebenfalls T_{regs} induzieren und die Funktion von Effektor-T-Zellen unterdrücken (Whiteside, 2009; Facciabene et al., 2012). Verschiedene lösliche Faktoren, die von Tumorzellen und T_{regs} sezerniert werden, können zudem die Funktion und Ausreifung von DCs inhibieren. Als Folge stehen zu wenig reife DCs zur Induktion einer effektiven Tumor-gerichteten Immunantwort zur Verfügung. Die unreifen DCs präsentieren Tumorantigene ohne kostimulatorische Moleküle und induzieren damit Toleranz gegenüber Tumorzellen. Unreife DCs sind außerdem in der Lage, T_{regs} zu generieren (Gabrilovich, 2004; Dhodapkar et al., 2008; Dudek et al., 2013).

1.4 Infiltration von Tumoren durch Immunzellen

Ausgehend von ihrer intensiven Interaktion mit dem Immunsystem wachsen Tumoren umgeben von einem Netzwerk aus Blut- und Lymphgefäßen, Fibroblasten, Zytokinen, Chemokinen und Tumor-infiltrierenden Immunzellen. Diese Immuninfiltrate haben einen stark heterogenen Charakter abhängig vom Tumortyp. Jedes dieser Elemente des Mikromilieus kann das Fortschreiten der Tumorerkrankung sowohl positiv als auch negativ beeinflussen. Das Tumordinfiltrat setzt sich aus verschiedenen Arten von Immunzellen zusammen: Makrophagen, DCs, NK-Zellen, Mastzellen, naive B- und T-Lymphozyten, sowie deren Effektor-Subpopulationen und Gedächtniszellen. Die Zellen können sowohl im Tumorzentrum, im invasiven Randbereich als auch in Tumor-assoziierten TLS lokalisiert sein (Fridman et al., 2012; Fridman et al., 2014).

Im Verlauf der Entwicklung eines Tumors aus einer präkanzerösen „in situ“ Läsion hin zu invasivem Wachstum und Metastasierung verändert sich auch die Zusammensetzung des Immunzellinfiltrats. Zunächst ist das Mikromilieu geprägt von einer Tumor-gerichteten Immunantwort mit M1-Makrophagen, NK-Zellen, T_H1, T_H17 und CTLs, assoziiert mit einer

starken Expression von Zytokinen wie IL-12, IFN- γ und induzierbarer NO-Synthase. Mit zunehmender Invasion der malignen Zellen erfolgt ein Wechsel zu vermehrter Infiltration mit Tumorwachstum fördernden M2-Makrophagen, T_{regs} und T_H2-Zellen in einer verstärkt von Immunsuppression und Neovaskularisierung geprägten Umgebung. Die Tumorzellen tragen dazu mit der Sekretion von immunsuppressiven und proangiogenetischen Botenstoffen wie VEGF und dem Anlocken von immunsuppressiven MDSCs durch Chemokine bei. Auch in Metastasen kann eine Immunzellinfiltration nachgewiesen werden, welche häufig Ähnlichkeiten mit dem Infiltrat des Primärtumors aufweist (Fridman et al., 2014).

In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass infiltrierende CD3⁺ T-Lymphozyten, CTLs und Gedächtnis-T-Lymphozyten in vielen Tumoren, z. B. im kolorektalen Karzinom (KRK), Melanom oder Mammakarzinom, mit verlängertem krankheitsfreien und/oder Gesamtüberleben assoziiert sind. Das Nierenzellkarzinom stellt dabei eine Ausnahme dar (Pages et al., 2005; Galon et al., 2006; Pages et al., 2009; Fridman et al., 2012). Im Falle von CD4⁺ T-Zellen werden die einzelnen Subpopulationen bezüglich klinischer Bedeutung getrennt betrachtet. T_{regs} wurden in verschiedenen Veröffentlichungen sowohl mit einer schlechten Prognose als auch mit verlängertem Überleben verknüpft (Fridman et al., 2012). Im KRK wurde eine Infiltration mit FOXP3⁺ T_{regs} in mehreren Veröffentlichungen als unabhängiger Marker für verlängertes krankheitsfreies Überleben identifiziert (Salama et al., 2009; Frey et al., 2010). Möglich wären verschiedene Funktionen abhängig vom Mikromilieu: die Blockade von wachstumshemmenden Effekten oder die Unterdrückung tumorfördernder chronischer Entzündungsprozesse (Fridman et al., 2012). Auch die Bedeutung von T_H2- und T_H17-Zellen in der Tumorprogression ist Gegenstand derzeitiger Untersuchungen. Tosolini et al. zeigten, dass eine hohe Dichte von T_H17-Zellen im KRK mit einer schlechten Prognose assoziiert ist. T_H2-Zellen konnte in ihrer Studie jedoch keine prognostische Relevanz zugeschrieben werden (Tosolini et al., 2011). Im Gegensatz dazu wurden T_H1-Zellen bisher in zahlreichen Tumorentitäten mit einem starken Überlebensvorteil assoziiert (Tosolini et al., 2011; Fridman et al., 2012; Fridman et al., 2014). Zudem bietet eine intensive intratumorale Infiltration mit CD57⁺ NK-Zellen im KRK einen Überlebensvorteil (Coca et al., 1997), ebenso konnte eine verbesserte Prognose bei einer Infiltration mit Makrophagen gezeigt werden (Forssell et al., 2007; Edin et al., 2013).

1.5 Kolonkarzinome

Der Begriff des KRKs umfasst die epithelialen Tumoren des gesamten Kolon- und Rektumabschnittes des Darms. Mit ca. 1,4 Millionen Diagnosen und über 690.000 Todesfällen im Jahr 2012 weltweit, ist das KRK die dritthäufigste Krebsart bei Männern und die zweithäufigste Tumordiagnose bei Frauen (Torre et al., 2015). Die höchsten Inzidenzen finden

sich in Australien, Neuseeland, Nordamerika und Europa in Assoziation mit dem sogenannten „western lifestyle“, die geringsten Erkrankungsraten lassen sich in Afrika, Südasien und Zentralasien nachweisen. Männer erkranken signifikant häufiger als Frauen und das Erkrankungsrisiko steigt mit zunehmendem Alter (Torre et al., 2015). Die 5-Jahres-Überlebensrate beim KRK liegt im Durchschnitt bei 64 % und variiert von 90 % bei Detektion im Frühstadium bis weniger als 12 %, wenn bei Diagnosestellung bereits Fernmetastasen vorliegen (Siegel et al., 2012).

Als Risikofaktoren für diese Tumorerkrankung gelten u. a. eine positive Familienanamnese, entzündliche Darmerkrankungen, Nikotinabusus, körperliche Inaktivität, Übergewicht, häufiger Genuss von rotem Fleisch und exzessiver Alkoholkonsum (Brenner et al., 2014). Klinisch können die Tumoren durch eine Hämatochezie (Auftreten von frischem Blut im Stuhl) oder eine Anämie aufgrund kontinuierlicher oder intermittierender Karzinomblutungen in Erscheinung treten. Ein Großteil der Neoplasien bleibt jedoch lange Zeit asymptomatisch und wird meist im Rahmen von Screening-Untersuchungen entdeckt. Unspezifische Symptome umfassen Veränderung der Stuhlgewohnheiten, Leistungsminderung, Fieber, Gewichtsverlust oder abdominale Schmerzen. Bei weit fortgeschrittenen Karzinomen kann eine Ileussyndromatik im Vordergrund stehen (Herold, 2015).

Primäre Präventionsstrategien schließen die Eliminierung von Risikofaktoren ein, zusätzlich werden die Einnahme von Aspirin, eine Hormonersatztherapie oder Vitamin D als vorbeugende Maßnahmen, besonders für Risikogruppen, diskutiert. Aufgrund der guten Überlebensraten bei frühzeitiger Diagnosestellung spielt eine sekundäre Prävention in Form von Screening-Untersuchungen beim KRK eine wichtige Rolle. Für regelmäßige Stuhltests auf okkultes Blut und Koloskopien mit Polypektomie oder flexible Sigmoidoskopien wurde eine deutliche Reduktion von Inzidenz und Mortalität nachgewiesen. Diese Untersuchungen werden daher in vielen Ländern inklusive Deutschland für Männer und Frauen mit durchschnittlichem Erkrankungsrisiko ab dem 50. Lebensjahr empfohlen (Hewitson et al., 2008; Brenner et al., 2011; Qaseem et al., 2012).

1.5.1 Entwicklung, Charakteristika und Klassifikation kolorektaler Karzinome

95 % aller bösartigen Tumoren des menschlichen Darms sind epitheliale Neubildungen des Kolon und Rektums, in anderen Darmabschnitten sind diese Karzinome nur vereinzelt anzutreffen. Viel seltener als KRKs sind neuroendokrine Neoplasien der Darmschleimhaut, maligne Entartungen der glatten Muskulatur (Leiomyosarkome) oder gastrointestinale Stromatumoren. Zusätzlich ist die Ausprägung von Lymphomen als maligne Neubildungen des lymphatischen Gewebes des Darms möglich (Bosman, 2010).

Die meisten Karzinome sind im Bereich des Colon sigmoideum und des Rektums lokalisiert, mit zunehmendem Alter nimmt jedoch der Anteil proximal gelegener Tumoren zu. Histologisch handelt es sich bei den Tumoren epithelialen Ursprungs zu 90% um Adenokarzinome in verschiedenen histopathologischen Varianten, d. h. aus dem Drüsengewebe des Darmepithels hervorgegangene bösartige Neubildungen. Neben Adenokarzinomen werden noch seltenere epitheliale Neoplasien, wie spindelzellige oder adenosquamöse Karzinome, und eine hochgradig undifferenzierte Form unterschieden (Bosman, 2010).

Die molekulare Pathogenese der Karzinome aus unterschiedlichen Vorläuferläsionen stellt einen sehr heterogenen Prozess dar. Ein Großteil der Tumoren entsteht über einen Zeitraum von mehr als zehn Jahren aus dysplastischen Adenomen der Mukosa über die sorgfältig charakterisierte Adenom-Karzinom-Sequenz, einer Akkumulation von Mutationen in Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen nach dem klassischen mehrstufigen Modell der Karzinogenese. Ein frühes Schlüsselereignis in dieser Sequenz ist die Mutation des „*adenomatous-polyposis-coli*“-Gens. Es folgen u. a. aktivierende *KRAS*-Mutationen und die Inaktivierung des Tumorsuppressors *p53*. Begleitet werden diese Mutationen häufig von einer chromosomalen Instabilität, d. h. Veränderungen in Anzahl und Struktur der zellulären Chromosomen (Fearon, 2011; Brenner et al., 2014). Rund 30 % der Karzinome entwickeln sich aus serratierten Vorläuferläsionen, wie z. B. dem sessil serratierten Adenom, und weisen zum Teil eine prognostisch günstige Mikrosatelliteninstabilität (MSI) durch Promotormethylierung von sogenannten „mismatch repair“-Genen, verantwortlich für DNA-Reparaturen, auf (Bettington et al., 2013).

Während die meisten Karzinome sporadisch entstehen, entwickeln sich ca. 2-5 % der Tumoren auf Grundlage hereditärer Erkrankungen. Zu diesen Erkrankungen zählen das Lynch-Syndrom (hereditäres non-polypöses kolorektales Karzinom), die familiäre adenomatöse Polyposis, die MUTHY-assoziierte Polyposis und verschiedene hamartomatöse Polyposis-Syndrome. Zusätzlich zu diesen eng umschriebenen genetischen Syndromen weisen bis zu einem Drittel aller Karzinome eine familiäre Häufung auf (Jasperson et al., 2010).

Die Einteilung der Karzinome erfolgt anhand der TNM-Klassifikation (Tabelle 1) nach lokaler Invasionstiefe (T), Lymphknotenbefall (N) und dem Auftreten von Fernmetastasen (M). Die einzelnen Merkmale werden in vier Stadien der „union internationale contre le cancer“ (UICC)-Klassifikation zusammengefasst (Tabelle 2), welche die Grundlage therapeutischer Entscheidungen bildet und prognostische Aussagen erlaubt (Bosman, 2010; Sobin et al., 2010). Auch molekularpathologische Charakteristika ermöglichen Prognoseschätzungen und Aussagen bzgl. des therapeutischen Ansprechens. Eine Defizienz von DNA-Reparatur-Enzymen führt zu zahlreichen Insertionen und Deletionen in Mikrosatelliten entlang des

gesamten Genoms. Diese daraus resultierende MSI ist mit einer besseren Prognose als ein stabiler Status assoziiert (Popat et al., 2005). Dazu trägt u. a. das verstärkte Immunzellinfiltrat, besonders durch Tumor-infiltrierenden Lymphozyten, bei. Dieses weist auf eine intensive Tumor-gerichtete Immunantwort hin, wahrscheinlich resultierend aus einem großen Angebot von Antigenen, generiert durch Leserasterverschiebungen aufgrund der variierenden Längen der Mikrosatelliten (Dolcetti et al., 1999; Schwitalle et al., 2008). Auch unabhängig vom Mikrosatellitenstatus haben sich Art, Dichte und Lokalisation Tumor-infiltrierender Immunzellen im KRK als prognostisch relevant erwiesen. Auf Basis dieser Beobachtungen findet derzeit die Etablierung des sogenannten Immunoscores als neues Werkzeug zur Klassifikation von KRKs statt (Galon et al., 2006; Galon et al., 2014). Ein bisher entwickeltes Modell basiert auf der Quantifizierung von verschiedenen Lymphozyten-Populationen (CD3/CD45RO, CD3/CD8 oder CD8/CD45RO) sowohl im Tumorzentrum als auch im invasiven Randbereich und wurde bisher an zwei großen unabhängigen Kohorten von KRK-Fällen angewendet. Bisher konnte eine Überlegenheit des Immunoscores gegenüber der bisher verwendeten TNM/UICC-Klassifikation des KRKs (siehe Tabelle 1 und Tabelle 2) bezüglich prognostischer Relevanz gezeigt werden. Dies würde bedeuten, dass weniger Charakteristika des Tumors selbst, als vielmehr das Immunzellinfiltrat eine entscheidende Rolle in der Vorhersage von Rezidiven und dem Auftreten von Metastasen und damit dem Gesamtüberleben spielen. Der individuelle Wert liegt zwischen Immunoscore 0 bei einer geringen Infiltration beider Regionen und damit schlechter Prognose und 4 mit einer hohen Dichte der beiden Lymphozyten-Populationen und guter Prognose. In frühen Tumorstadien wird derzeit als alleinige Therapie eine OP durchgeführt, liegt jedoch ein niedriger Immunoscore vor, könnten diese Betroffenen dennoch von einer adjuvanten Therapie profitieren. Auch eine Evaluierung des Immunzellinfiltrats zur Vorhersage des Ansprechens auf eine Therapie wäre wünschenswert (Galon et al., 2012; Galon et al., 2014).

1.5.2 Therapieansätze des Kolonkarzinoms

Die Therapieentscheidung erfolgt auf Basis der Zuordnung der Tumorerkrankung in ein UICC-Stadium anhand der Eigenschaften des Primärtumors und einer möglicherweise stattgefundenen Metastasierung. Für dieses „Staging“ sollte mindestens eine komplette Koloskopie, die Bestimmung des Tumormarkers „carcinoembryonic antigen“ (CEA), eine Abdomensonografie zur Detektion möglicher Lebermetastasen und ein Röntgen-Thorax zum Ausschluss von Lungenmetastasen erfolgen (Engstrom et al., 2009; Labianca et al., 2013; Pox et al., 2014).

Die kurative chirurgische Therapie nicht-metastasierter Kolonkarzinome besteht in der offenen oder laparoskopischen en-bloc-Resektion des tumortragenden Kolonabschnitts mit kompletter

mesokolischer Exzision, d. h. mit Entfernung des die Tumor-drainierenden Lymphknoten enthaltenden Mesenteriums. Lokalisationsabhängig erfolgt also eine Hemikolektomie rechts bzw. links, eine Resektion des Colon transversums oder eine Sigmaresektion, jeweils mit Ligatur der versorgenden Arterienäste aus der Arteria mesenterica superior bzw. inferior (Labianca et al., 2013; Pox et al., 2014).

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms

T – Primärtumor	
Tx	keine Informationen über lokale Tumordinfiltration verfügbar
T0	kein Hinweis auf einen Primärtumor vorhanden
Tis	Carcinoma in situ (Tumorzellen intraepithelial nachweisbar oder Invasion der Lamina propria)
T1	Tumor infiltriert die Submukosa
T2	Tumor infiltriert die Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert die Subserosa oder nicht peritonealisiertes perikolisches oder perirektales Gewebe
T4	Tumor perforiert das viszerale Peritoneum und/oder infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen
N – regionale Lymphknoten	
Nx	keine Aussagen über Metastasen in regionalen Lymphknoten möglich
N0	keine regionalen Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1-3 regionalen Lymphknoten
N2	Metastasen in 4 oder mehr regionalen Lymphknoten
M – Fernmetastasen	
Mx	keine Aussagen über Fernmetastasen möglich
M0	keine Fernmetastasen vorhanden
M1	Fernmetastasen vorhanden

modifiziert nach (Bosman, 2010)

Tabelle 2: UICC-Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms

Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1, T2	N0	M0
II	T3, T4	N0	M0
III	jedes T	N1, N2	M0
IV	jedes T	jedes N	M1

modifiziert nach (Bosman, 2010)

Eine anschließende adjuvante Chemotherapie ist bei Lymphknotenbefall (UICC-Stadium III) indiziert und kann im Stadium UICC II nach individueller Risikoeinschätzung ebenfalls erwogen werden. Die adjuvante Therapie erfolgt meist nach dem „FOLFOX“-Schema, bestehend aus den Zytostatika Oxaliplatin und 5-Fluorouracil und dem Folsäuremetabolit Folinsäure (Labianca et al., 2013; Pox et al., 2014).

Bei rund 20 % der KRK-Erstdiagnosen liegen bereits Fernmetastasen vor. Die Metastasierung des KRKs erfolgt zunächst lymphatisch in die perikolisch gelegenen Lymphknoten und schreitet entlang der radiär angeordneten Arterien fort bis zu den zentralen, am Arterienstamm lokalisierten Lymphknoten. Zudem kann sich durch lokale Tumorzellabsiedlung eine Peritonealkarzinose ausbilden. Von einer späteren hämatogenen Tumorzellaussaat sind am häufigsten die Leber und die Lunge betroffen. Seltener treten Knochen- oder Hirnmetastasen auf (Brenner et al., 2014). Wichtige Entscheidungskriterien zur Planung einer Chemotherapie stellen hier auch der Allgemeinzustand, die Organfunktion und Begleiterkrankungen dar. Bei weit fortgeschrittener Erkrankung mit irresektablen Metastasen liegt eher eine palliative Therapieintention mit Focus auf Lebensqualität und Symptomkontrolle vor. Für die medikamentöse Behandlung stehen Monotherapien mit 5-FU oder Kombinationsschemata aus 5-FU, Folinsäure, Oxaliplatin oder dem Zytostatikum Irinotecan zur Verfügung. Außerdem finden monoklonale Antikörper in verschiedenen Kombinationen mit eben genannten Chemotherapeutika Anwendung (van Cutsem et al., 2014; Pox et al., 2014): Cetuximab und Panitumumab binden und blockieren den „epidermal growth factor receptor“ (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor), ein Protein aus der Familie der transmembranösen Proteinkinase-Rezeptoren, welcher die Wirkungen des Wachstumsfaktors „epidermal growth factor“ (epidermaler Wachstumsfaktor) vermittelt. Ein weiterer Wachstumsfaktor, der „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) kann durch den monoklonalen Antikörper Bevacizumab

neutralisiert werden und trägt eine Schlüsselfunktion in der Gefäßversorgung von Tumoren (Arnold und Seufferlein, 2010).

Immuntherapeutische Ansätze sollen das menschliche Immunsystem zur Bekämpfung des Tumors mobilisieren (Couzin-Frankel, 2013; Markman und Shiao, 2015). Eine Herangehensweise ist die Verstärkung der Tumor-gerichteten Immunantwort durch Vakzinierungen mit Tumorzelllysaten oder Peptiden, immunstimulatorische Zytokine (z. B. IFN oder „granulocyte-macrophage colony-stimulating factor“) oder durch adoptiven Immunzelltransfer von CTLs oder NK-Zellen. Andere Ansätze haben die immunsuppressiven Mechanismen des Tumors als Ziel, z. B. die sogenannten „checkpoint“-Inhibitoren wie Antikörper gegen CTLA-4, PD-1 oder PD-1L (Markman und Shiao, 2015). Auch einige der bereits regelmäßig eingesetzten Therapiemethoden wirken immunmodulatorisch wie z. B. bestimmte Chemotherapeutika durch die Induktion von immunogenem Zelltod oder VEGF-Inhibitoren über die Reduktion Tumor-induzierter T_{regs} (Pernot et al., 2014).

DCs spielen eine zentrale Rolle in der Aktivierung von tumorspezifischen T-Lymphozyten, indem sie sowohl Tumorantigene in prozessierter Form als auch die benötigten kostimulatorischen Signale zur Verfügung stellen. Daher liegt es nahe, auch DCs für Tumorstabilisierungen in Erwägung zu ziehen (Dhodapkar et al., 2008; Palucka und Banchereau, 2013). Die DCs werden dafür ex vivo mit synthetischen Peptiden von bekannten Tumorantigenen, Tumorzelllysaten oder apoptotischen Tumorzellen beladen. Eine weitere Möglichkeit ist die direkte Mobilisierung von DCs *in vivo* (im Tumor oder in lymphatischen Geweben) durch Applikation von bestrahlten Tumorzellen oder von Tumorantigen-gekoppelten monoklonalen Antikörpern, welche gegen Antigenaufnahme-Rezeptoren auf der Oberfläche von DCs gerichtet sind. Die so präparierten DCs sollen nach Injektion in die T-Zell-Zonen von SLOs migrieren und dort eine adaptive Tumor-gerichtete Immunantwort induzieren (Lesterhuis et al., 2006; Steinman und Banchereau, 2007; Palucka und Banchereau, 2012; Markman und Shiao, 2015). DC-basierte KKK-Vakzinierungen wurden bisher z. B. mit CEA getestet und führten dort zu einer detektierbaren antigenspezifischen T-Zell-Antwort (Lesterhuis et al., 2006; Lesterhuis et al., 2010).

1.6 Zielstellung

Das Kolonkarzinom ist gekennzeichnet durch ein vielfältiges Immunzellinfiltrat. Die Bedeutung einzelner Immunzell-Populationen, wie $CD8^+$ T-Lymphozyten und die verschiedenen Subpopulationen von $CD4^+$ T-Lymphozyten, wurde in den letzten Jahren intensiv untersucht. Dabei ist eine dichte Infiltration mit $CD3^+$, $CD45RO^+$ oder $CD8^+$ Lymphozyten mit einer guten Prognose unabhängig vom UICC-Stadium assoziiert. Dieses Immunzellinfiltrat könnte im

Rahmen des derzeit in Etablierung befindlichen Immunoscores in die Klassifikation von KRKs eingebunden werden und eine zunehmende Rolle in therapeutischen Entscheidungen spielen. Weniger hingegen ist bekannt über infiltrierende native DCs in Kolonkarzinom-Geweben, insbesondere verschiedene DC-Subpopulationen. Bisherige Veröffentlichungen verwendeten Marker wie S-100, HLA-DR oder CD83 um DCs im Kolonkarzinom nachzuweisen. Diese Oberflächenstrukturen sind jedoch weder auf DCs beschränkt, noch spezifisch für eine bestimmte Subpopulation.

SlanDCs stellen eine myeloide Subpopulation von DCs mit starker proinflammatorischer Kapazität dar. Sie sind in der Lage große Mengen $\text{TNF-}\alpha$, IL-12 oder IL-23 zu produzieren und können tumorspezifische CTLs induzieren. Zudem unterstützen sie NK-Zellen und besitzen die Fähigkeit, über verschiedene Mechanismen Tumorzellen zu lysieren. Diese Eigenschaften lassen eine wichtige Rolle von slanDCs in der Induktion einer Tumor-gerichteten Immunantwort vermuten. Bisher wurde die Akkumulation von slanDCs in Lymphknotenmetastasen beschrieben, in Primärtumoren konnten die Zellen laut dieser Veröffentlichung nicht in relevanter Frequenz detektiert werden. Kürzlich wurden slanDCs jedoch mittels immunhistochemischer Färbungen in Nierenzellkarzinom-Geweben nachgewiesen. Eine erhöhte Frequenz mit diesen DCs konnte mit einer schlechten Prognose assoziiert werden. In Untersuchungen von slanDCs, welche aus frisch operierten Nierenzellkarzinomen isoliert wurden, wiesen die Zellen einen tolerogenen Phänotyp auf.

Um neue Erkenntnisse hinsichtlich des Vorkommens und des Phänotyps von slanDCs im Kolonkarzinom zu gewinnen, wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmals slanDCs in entsprechenden Tumorgeweben und in korrespondierenden tumorfreien Kolon-Geweben untersucht. Vergleichend erfolgte zudem eine Analyse der pDC-Infiltration von Kolonkarzinom-Geweben. Dafür wurden vielfältige immunhistochemische Färbungen an Präparaten eines Patientenkollektivs vorgenommen, um Aussagen über die Frequenz der infiltrierenden slanDCs zu treffen und die Expression des Oberflächenmarkers CD83 und der Zytokine IL-23 und $\text{TNF-}\alpha$ zu untersuchen. Des Weiteren wurde eine Kolokalisation mit anderen Tumor-infiltrierenden Immunzellen analysiert. Die erhobenen Daten bieten eine Grundlage für ein Verständnis der Rolle von slanDCs im Kolonkarzinom und könnten einen Beitrag zur Entwicklung neuer immuntherapeutischer Strategien leisten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

„Aqua ad iniectabilia“ (Aqua bidestillata)	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Eindeckmedium (Alkalische Phosphatase (AP)-Färbungen)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
„AKLIDES ANA plus, mount“ (Eindeckmedium, Fluoreszenzfärbungen)	Medipan GmbH, Dahlewitz, Deutschland
Ethanol (96 %-ig und 80 %-ig, vergällt)	Berkel AHK, Ludwigshafen, Deutschland
Ethanol (absolut, vergällt)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Hämalaunlösung nach Mayer	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Xylol	VWR International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, Frankreich

2.1.2 Lösungen und Puffer

Verdünnungspuffer (AP-Färbung)	Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland
Verdünnungspuffer (Fluoreszenzfärbung)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Waschpuffer (AP- und Fluoreszenzfärbung) <i>1l Lösung:</i> <i>50ml Waschpuffer</i> <i>950ml Aqua destillata</i> <i>Lagerung bei Raumtemperatur</i>	Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland
„heat induced epitope retrieval“ (HIER) Zitratpuffer (AP- und Fluoreszenzfärbung) <i>100ml Lösung:</i> <i>10ml Zitratpuffer</i> <i>90ml Aqua destillata</i>	Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland

2.1.3 Testkitsysteme

EnVision™ G 2 System/AP, Rabbit/Mouse	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
---------------------------------------	---

2.1.4 Antikörper zur Detektion von Oberflächenmolekülen

Maus Anti-human 6-sulfo LacNAc	Institut für Immunologie, Medizinische Fakultät, Technische Universität, Dresden, Deutschland
Maus Anti-human CD303	Dendritics, Lyon, France
Kaninchen Anti-human TNF- α	Abcam®, Cambridge, UK
Kaninchen Anti-human IL23 P19	Abcam®, Cambridge, UK
Maus Anti-human CD83	Abcam®, Cambridge, UK
Ziege Anti-human CD4	R&D Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota, USA
Kaninchen Anti-human CD3	Abcam®, Cambridge, UK
Maus Anti-human CD20	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Ziege Anti-human CD20	Everest Biotech Ltd, Oxfordshire, UK
Ziege F(ab') ₂ Anti-Maus IgM Biotin	Southern Biotech , Birmingham, Alabama 35209, USA
Ziege F(ab') ₂ Anti-Kaninchen IgG AF488	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ziege F(ab') ₂ Anti-Kaninchen IgG AF633	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ziege Anti-Maus IgG (H+L) AF488	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Esel Anti-Ziege IgG (H+L) AF488	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Esel Anti-Ziege IgG (H+L) AF594	Abcam®, Cambridge, UK
Streptavidin AF546	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland

2.1.5 Seren

normales Mausserum	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
--------------------	---

2.1.6 Geräte

Wärmeschrank	Memmert GmbH und Co. KG, Schwabach, Deutschland
Feuchte Kammer	Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland
Kompaktes Fluoreszenzmikroskop HS BZ9000E (BIOREVO)	Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland
Axio Scan.Z1 Slidescanner	Carl Zeiss, Deutschland
Werkbank	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Dampftopf	Braun GmbH, Deutschland

2.1.7 Sonstige Materialien

Costar Stripette (Serologische Pipetten: 5ml; 10ml; 25ml)	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Eppendorf Reaktionsgefäße (0,5ml; 1,5ml; 2,5ml)	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg, Deutschland
Pipettensatz (0,1-2 µl; 0,5-10 µl; 2-20 µl; 10-100 µl; 50-250 µl; 200-1000 µl)	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipettierhilfe	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg, Deutschland
Deckgläser	Engelbrecht GmbH, Edermünde, Deutschland
Filterpapier	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Glaswaren	Brand GmbH und Co. KG, Wertheim, Deutschland
Handschuhe	Kimberly-Clark, Rosewell, USA

2.1.8 Gewebeproben

Für den Nachweis und die Phänotypisierung nativer slanDCs und pDCs in Kolonkarzinom-Geweben und tumorfreien Kolon-Geweben wurden Gewebeproben operativ entfernter

Karzinome bzw. die tumorfreien Resektionsränder in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und anschließend auf Objektträger überführt. Die fertigen Präparate wurden dem Institut für Immunologie durch das Institut für Pathologie (Dr. Ulrich Sommer und Prof. Dr. Gustavo Baretton) zur Verfügung gestellt. Die pathologischen Charakteristika des Patientenkollektivs sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Pathologische Charakteristika des Patientenkollektivs

Alter bei OP in Jahren, Median (Spannweite)	70 (44–96)
Merkmale	Patientenanzahl
Geschlecht (n / %)	
weiblich	23 / 48,9 %
männlich	24 / 51,1 %
T – Tumorgroße (n / %)	
T1/2	25 / 53,2 %
T3/4	22 / 46,8 %
N – Lymphknotenstatus (n / %)	
N0	29 / 61,7 %
N1	18 / 38,3 %
M – Fernmetastasen (n / %)	
M0	44 / 93,6 %
M1	3 / 6,3 %
Histopathologisches Grading (n / %)	
G1/2	20 / 42,6 %
G3/4	27 / 57,4 %

2.2 Methoden

2.2.1 Vorbereitung der Gewebeproben zur Immunmarkierung

Für die indirekte Immunmarkierung wurden die formaldehydfixierten und paraffineingebetteten Schnitte zunächst entparaffiniert. Dies geschah durch 30-minütiges Erwärmen im Wärmeschrank bei 60 °C und anschließende zweimalige Inkubation in Xylol für jeweils 15 min. Es folgte eine schrittweise Rehydratisierung der Präparate zur Anpassung an die zur Färbung eingesetzten wässrigen Lösungen. Dazu wurde eine Alkoholreihe mit absteigenden Konzentrationen verwendet. Die Objektträger wurden für jeweils 10 min zunächst in absolutem vergälltem Alkohol, danach zweimalig in 96 % vergälltem Alkohol und schließlich in 80 % vergälltem Alkohol inkubiert. Abschließend erfolgte eine zehnminütige Inkubation in destilliertem Wasser.

Die ursprüngliche Fixierung der Gewebe kann die Konformation mancher Antigene derart verändern, dass eine Bindung von Antikörpern nicht mehr möglich ist. Zur Wiederherstellung der Antigenität der Präparate wurde eine Epitopdemaskierung durchgeführt, wofür die Gewebeschnitte 20 min im vorgeheizten Dampfgerar in Zitratpuffer gekocht wurden. Anschließend kühlten die Schnitte im Zitratpuffer verbleibend ca. 45-60 min auf Raumtemperatur ab. Zum Abschluss der Vorbereitung für die Färbungen erfolgte eine ca. fünfminütige Spülung in Waschpuffer (Abbildung 1).

Zwischen den einzelnen Schritten der unterschiedlichen immunhistochemischen Färbungen wurden die Schnitte meist zwei bis dreimal für je 2-3 min in Waschpuffer gespült. Dadurch sollen nicht-gebundene Antikörper aus den Geweben und der Umgebung entfernt werden. Je nach Schnittgröße wurden zur Eindeckung mit der entsprechenden Antikörperlösung zwischen 150-200 µl pro Objektträger verwendet. Alle Inkubationen fanden in einer feuchten Kammer statt, bei der Verwendung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern erfolgten diese zudem lichtgeschützt. Die verwendeten Antikörper und deren Verdünnungen sind der Tabelle 4 zu entnehmen.

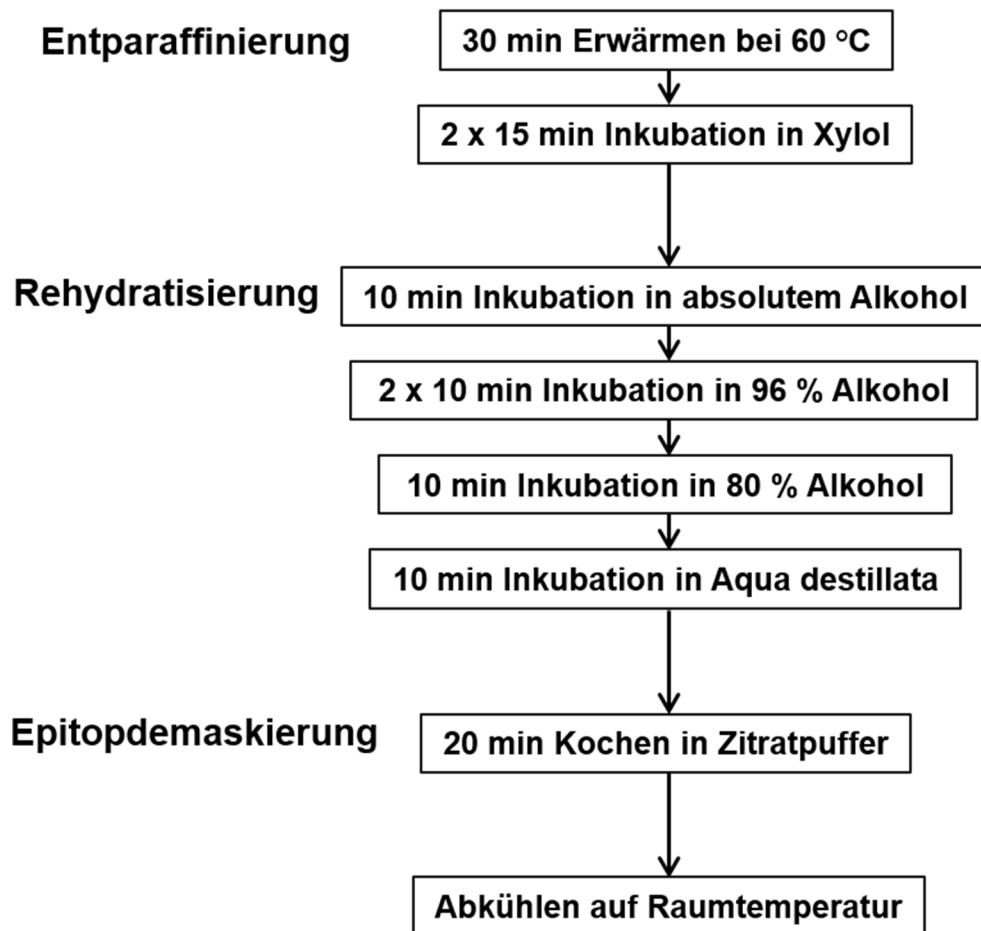


Abbildung 1: Ablauf der Vorbereitung der Präparate für die immunhistochemischen Färbungen.

2.2.2 Immunhistochemischer Nachweis von slanDCs und pDCs in Kolonkarzinom-Gewebe und tumorfreien Kolon-Gewebe

Zur lichtmikroskopischen Visualisierung nativer slanDCs und pDCs in Kolonkarzinom-Gewebe und tumorfreien Kolon-Gewebe wurden die gemäß 2.2.1 vorbereiteten Objektträger zunächst mit einer verdünnten Maus Anti-human slan Antikörperlösung bzw. einer Maus Anti-human CD303 Antikörperlösung über Nacht (17-20 h) bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Für die nächsten Schritte wurde das EnVision™ G|2 Detektionssystem verwendet. Die Präparate wurden gewaschen und mit bereits gebrauchsfertigen, dextranekoppelten Sekundärantikörpern (Kaninchen Anti-Maus/LINK) des Kits bedeckt. Diese Sekundärantikörper richten sich gegen die jeweiligen Primärantikörper, welche bereits an die Zielstrukturen im Gewebe gebunden haben. Nach 30-minütiger Inkubation und erneutem Waschen wurden die Schnitte nun für weitere 30 min mit der gebrauchsfertigen ENHANCER-Lösung des Kits überschichtet. Diese enthält das Enzym AP, welche die Umsetzung des nachfolgenden Substrats katalysiert und so die Auswertung der zu detektierenden Strukturen unter dem Lichtmikroskop ermöglicht. Anschließend wurden die Objektträger mit einer frisch

hergestellten Substratlösung des EnVision™ G|2 Detektionssystems inkubiert. Die darauffolgende Reaktion wurde beobachtet und die Inkubation bei deutlich sichtbarer Rot- oder Rosafärbung bzw. spätestens nach 10 min mit destilliertem Wasser gestoppt. Es erfolgte zusätzlich eine Gegenfärbung mit frisch gefiltertem und verdünntem Hämalaun zur Darstellung der Zellkerne und des umliegenden Gewebes. Diese Färbung wurde je nach resultierender Intensität in zwei bis drei Durchgängen von jeweils 30-60 s und anschließender Spülung mit Leitungswasser durchgeführt. Abschließend wurden die gefärbten Objektträger eingedeckt und die Aufbewahrung erfolgte bei Raumtemperatur.

2.2.3 Untersuchung der Zytokinexpression von slanDCs in Kolonkarzinom-Geweben und tumorfreien Kolon-Geweben mit Fluoreszenzfärbungen

Mithilfe von Doppelfärbungen wurde die Expression der Zytokine TNF- α und IL-23 von slanDCs im Gewebe von Kolonkarzinomen bzw. tumorfreiem Kolon analysiert. Die, wie unter 2.2.1 beschrieben, vorbereiteten Schnitte wurden dafür sowohl mit Maus Anti-human slan Antikörpern, als auch mit gegen das jeweilige Zytokin gerichteten Antikörpern inkubiert. Die verwendeten Sekundärantikörper binden Epitope der jeweiligen Primärantikörper. Im Falle der TNF- α /slan-Kombinationsfärbung wurden die Objektträger zunächst für 17 h bei 4 °C mit einer verdünnten Lösung bestehend aus Kaninchen Anti-human TNF- α Antikörpern und Anti-human slan Antikörpern inkubiert. Für den Nachweis einer IL-23-Expression wurden die Anti-human slan Antikörper gemeinsam mit gegen IL-23-gerichteten Antikörpern verdünnt und es erfolgte eine 60-minütige Inkubation. Die darauffolgenden Schritte sind für beide Zytokinfärbungen identisch. Nach zwei Waschgängen wurden die Objektträger mit gemeinsam verdünnten biotinylierten bzw. mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor (AF) 488-gekoppelten Sekundärantikörpern (Ziege Anti-Kaninchen IgG AF488 und Ziege Anti-Maus IgM Biotin) bedeckt und für weitere 30 min inkubiert. Die AF 488-gekoppelten Antikörper binden dabei an die gegen TNF- α bzw. IL-23-gerichteten Primärantikörper. Die Zielstruktur der biotinylierten Sekundärantikörper sind die Anti-human slan Antikörper. Nach erneutem Waschen folgte eine 15-minütige Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem (AF 546) Streptavidin (Verdünnung: 1:500). Dieses Protein mit hoher Affinität für Biotin bindet die biotinylierten Ziege Anti-Maus IgM-Antikörper. Mittels Streptavidin erhält man ein vielfach verstärktes Signal und die starke Sensitivität ermöglicht auch die Detektion geringer Antigenmengen im Präparat. Abschließend wurden die Präparate mit einem Eindeckmedium überschichtet. Dieses enthält 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), einen DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff zur Detektion der Zellkerne. Die fertigen Objektträger wurden lichtgeschützt bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2.4 Nachweis der Expression von CD83 durch slanDCs in Kolonkarzinom-Geweben mit einer Fluoreszenzfärbung

Durch eine weitere Doppelfärbung wurde die Expression des Oberflächenmarkers CD83 durch slanDCs im Kolonkarzinom untersucht. Die Vorbereitung der Objektträger erfolgte wie unter 2.2.1 beschrieben und die Präparate wurden dann zunächst für 30 min mit einer Maus Anti-human CD83 Antikörperlösung inkubiert. Schließlich erfolgte für 20 min die Zugabe von AF 488-gekoppelten Sekundärantikörpern (Ziege Anti-Maus IgG). Nach einem Blockungsschritt zur Reduktion unspezifischer Bindungen mit normalem Mausserum (Verdünnung: 1:50) wurden die Objektträger für 1 h mit einer Anti-human slan Antikörperlösung überschichtet und anschließend mit biotinylierten Sekundärantikörpern (Ziege Anti-Maus IgM Biotin) inkubiert. Nach 15-minütiger Zugabe von fluoreszenzmarkiertem Streptavidin wurden die Präparate abschließend mit einem DAPI-haltigen Medium eingedeckt.

2.2.5 Analyse einer Kolokalisation von slanDCs und CD3⁺ T-Lymphozyten in Kolonkarzinom-Geweben

Zur Darstellung einer Kolokalisation von slanDCs und T-Lymphozyten in Kolonkarzinom-Geweben wurde eine Doppelfärbung der Oberflächenmarker CD3 und slan vorgenommen. Dafür wurden die, wie unter 2.2.1 beschrieben, vorbereiteten Objektträger zunächst für 60 min mit den gemeinsam verdünnten Kaninchen Anti-human CD3 und Maus Anti-human slan Antikörpern überschichtet. Nach einem Waschschrift erfolgte die Zugabe der entsprechenden fluoreszenzgekoppelten bzw. biotinylierten Sekundärantikörper, welche gegen die Primärantikörper gerichtet sind (Ziege Anti-Kaninchen IgG AF 488 und Ziege Anti-Maus IgM Biotin). Anschließend wurde fluoreszenzgekoppeltes Streptavidin zugegeben und nach einem letzten Waschschrift wurden die Präparate mit einem DAPI-haltigem Medium eingedeckt.

2.2.6 Detektion von slanDCs in tertiären lymphoiden Strukturen von Kolonkarzinom-Geweben

Für die Fragestellung einer Lokalisation von slanDCs in TLS wurde eine Dreifachfärbung des B-Zell-Markers CD20, des T-Zell-Markers CD3 und der slan-Struktur durchgeführt. Dafür erfolgte zunächst eine 30-minütige Inkubation der vorbereiteten Objektträger mit Maus Anti-human CD20 Antikörpern und anschließend die Zugabe der entsprechenden AF 488-markierten Sekundärantikörper (Ziege Anti-Maus IgG). Danach wurden die Präparate für 60 min mit Maus Anti-human slan und Kaninchen Anti-human CD3 Antikörpern in einer gemeinsamen Verdünnung überschichtet und im Anschluss wurden biotinylierte und AF 633-gekoppelte Sekundärantikörper (Ziege Anti-Maus IgM und Ziege Anti-Kaninchen IgG) zur Detektion der DCs unter dem Fluoreszenzmikroskop für 30 min zugegeben. Nach einer 15-

minütigen Inkubation mit AF 546-markiertem Streptavidin erfolgte abschließend die Eindeckung der Präparate mit einem DAPI-haltigem Medium.

Tabelle 4: Verwendete Antikörper bei den immunhistochemischen Färbungen

Antigen	Klon	Host/Isotyp	Label	Verdünnung bzw. eingesetzte Konzentration
Primärantikörper				
6-sulfo LacNAc (slan)	DD2 Klon 34	Maus IgM	unmarkiert	1:2; 1:10 oder 1:20
CD303	124B3.13	Maus IgG1	unmarkiert	10 µg/ml
TNF- α	polyklonal	Kaninchen IgG	unmarkiert	1:100
IL-23 P19	polyklonal	Kaninchen IgG	unmarkiert	1:200
CD83	1H4b	Maus IgG1	unmarkiert	1:100
CD4	polyklonal	Ziege IgG	unmarkiert	15 µg/ml
CD3	SP7	Kaninchen IgG	unmarkiert	1:100
CD20	L26	Maus IgG	unmarkiert	1:250
CD20	EB05140	Ziege IgG	unmarkiert	3 µg/ml
Sekundärantikörper				
Maus IgM		Ziege IgG	Biotin	1:100
Kaninchen IgG (H+L)		Ziege IgG F(ab') ₂ -Fragment	AF 488	1:100
Kaninchen IgG (H+L)		Ziege IgG F(ab') ₂ -Fragment	AF 633	1:100
Maus IgG (H+L)		Ziege IgG	AF 488	1:100
Ziege IgG (H+L)		Esel IgG	AF 488	1:100
Ziege IgG (H+L)		Esel IgG	AF 594	1:250

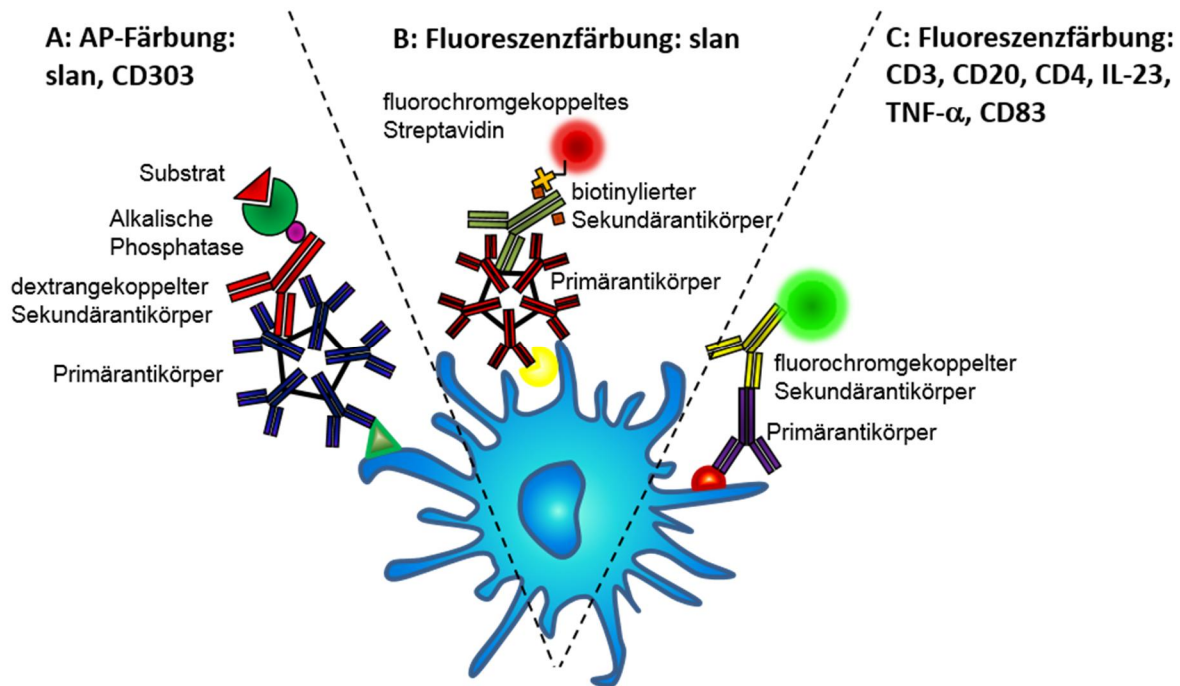


Abbildung 2: Prinzip der Alkalischen Phosphatase- und Fluoreszenzfärbungen. (A) Dargestellt ist die Färbung von slan und CD303 durch Maus Anti-human slan Antikörper und ein Detektionssystem (EnVision™ G|2 System/AP). Die dextrangekoppelten Kaninchen Anti-Maus Antikörper (LINK) des Kits binden die Primärantikörper, danach erfolgt die Zugabe von AP-Enzymen (ENHANCER), welche das abschließend hinzugefügte Substrat umsetzen und zur Rot- oder Rosafärbung der slan-Struktur führen. **(B)** Dieser Teil der Abbildung zeigt die Fluoreszenzfärbung der slan-Struktur mit Maus Anti-human slan Antikörpern und biotinylierten Sekundärantikörpern. An diesen kann dann fluorochromgekoppeltes Streptavidin binden und ermöglicht die Auswertung unter einem Fluoreszenzmikroskop. **(C)** Abgebildet ist die Fluoreszenzfärbung weiterer untersuchter Oberflächenmarker bzw. Zytokine mithilfe von Primärantikörpern und fluorochromgekoppelten Sekundärantikörpern, welche gegen die Primärantikörper gerichtet sind.

2.2.7 Nachweis der Expression von CD83 und Interleukin-23 durch slanDCs in TLS von Kolonkarzinom-Geweben

Anhand von immunhistochemischen Färbungen mit fünf verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen wurden CD83⁺ bzw. IL-23⁺ slanDCs in TLS nachgewiesen. Die Identifizierung der TLS erfolgte dabei mithilfe der T-Zell-Marker CD3 bzw. CD4 und dem B-Zell-Marker CD20. Zudem erfolgte eine Fluoreszenzfärbung der slan-Struktur und des Oberflächenmoleküls CD83 bzw. des Zytokins IL-23. Zum Nachweis der Expression von CD83⁺ slanDCs in TLS wurden die, wie unter 2.2.1 beschrieben, vorbereiteten Präparate zunächst für 60 min mit einer Ziege Anti-human CD20 Antikörperlösung inkubiert, anschließend erfolgte die 20-minütige Zugabe von AF 594-markierten Sekundärantikörpern (Esel Anti-Ziege IgG). Danach wurden die Objektträger für 30 min mit Maus Anti-human CD83 Antikörpern und nachfolgend für 20 min mit einer Ziege Anti-Maus IgG AF 488 Antikörperlösung inkubiert, bevor ein zehnminütiger Blockungsschritt mit normalem Mausserum folgte. Anschließend wurde die Präparate 60 min mit gemeinsam verdünnten

Maus Anti-human slan und Kaninchen Anti-human CD3 Antikörpern überschichtet und danach für 30 min mit den entsprechenden biotinylierten bzw. AF 633-gekoppelten Sekundärantikörpern (Ziege Anti-Maus IgM und Ziege Anti-Kaninchen IgG). Abschließend erfolgte nach einer 15-minütigen Inkubation mit AF 546-gekoppeltem Streptavidin eine Anfärbung der Zellkerne mithilfe eines DAPI-haltigen Eindeckmediums.

Für die Detektion von IL-23⁺ slanDCs in TLS wurden die Präparate im ersten Schritt 30 min mit einer Ziege Anti-human CD4 Antikörperlösung überschichtet und nachfolgend für 20 min mit Esel Anti-Ziege IgG AF 594 Antikörpern inkubiert. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit Maus Anti-human CD20 Antikörpern und danach die Zugabe von AF 633-gekoppelten Sekundärantikörpern (Ziege Anti-Maus IgG) für 20 min. Danach wurden die Objektträger mit einer verdünnten Lösung aus Kaninchen Anti-human IL-23 und Maus Anti-human slan Antikörpern inkubiert. Nach 60 min erfolgte die Zugabe der entsprechenden Sekundärantikörper (Ziege Anti-Kaninchen IgG AF 633 und Ziege Anti-Maus IgM Biotin) für weitere 30 min. Nach abschließender Inkubation mit AF 546 gekoppeltem Streptavidin für 15 min wurden die Präparate mit DAPI-haltigem Medium eingedeckt.

2.2.8 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von slanDCs und pDCs in Kolonkarzinom-Geweben und in tumorfreien Kolon-Geweben

Für eine Quantifizierung von slanDCs bzw. pDCs im Kolonkarzinom wurden die, wie in 2.2.2 beschrieben, AP-gefärbten Präparate eingescannt und das digitale Bildmaterial mit dem Programm „Image Viewer“ ausgewertet. Die Zählung erfolgte in je drei sogenannten „high power fields“ (HPFs) pro Objektträger mit einer durchschnittlichen Größe von 0,237 mm². Diese Hot-Spot-Methode erlaubt die Quantifizierung von Zellen in den Bereichen mit der höchsten Dichte an positiven Zellen eines Präparats. Als slanDCs/pDCs gewertet wurden Zellen mit deutlich, evtl. granulär rot gefärbter Zellmembran und einem intakten Zellkern.

Die Auswertung der Fluoreszenzfärbungen von slan/CD83, slan/TNF- α , slan/IL-23, slan/CD3 und slan/CD3/CD20 erfolgte mit dem kompakten Fluoreszenzmikroskop BZ-9000E (BIOREVO) und den dazugehörigen Programmen BZ-II Viewer und BZ-II Analyzer. Für die prozentuale Quantifizierung der Expression von Zytokinen bzw. Oberflächenmarker durch slanDCs wurden pro Präparat mind. 20 slanDCs gezählt und der Anteil an doppelt positiven Zellen ermittelt. Für die Erstellung der Abbildungen wurde zusätzlich das Bildbearbeitungsprogramm GIMP 2 (Version 8.14) verwendet.

Zur Auswertung der Fluoreszenzfärbungen zum Nachweis von CD83⁺ bzw. IL-23⁺ slanDCs in TLS im Kolonkarzinom wurden die Objektträger mit dem AxioScan.Z1 Slidescanner eingescannt und mit der Software ZEN 2 lite visualisiert. In den Präparaten erfolgte die

prozentuale Quantifizierung der CD83- bzw. IL-23-exprimierenden slanDCs innerhalb der TLS. Dafür wurden in den TLS abhängig von der verfügbaren Zellzahl zwischen 7 und 54 slanDCs ausgezählt. Auch diese Abbildungen wurden zusätzlich mithilfe des Bildbearbeitungsprogramm GIMP 2 (Version 8.14) erstellt.

2.2.9 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm Microsoft Excel und die IBM SPSS Statistics 15.0 Software verwendet. Für die Quantifizierung der slanDCs bzw. pDCs im Gewebe wurden die Zellen pro Quadratmillimeter anhand der jeweiligen HPF-Größe und den darin detektierten Zellen errechnet. Aus den drei erhaltenen Werten wurde das arithmetische Mittel gebildet und gemeinsam mit der Mittelabweichung angegeben. Diese stellt die mittlere absolute Abweichung der Werte von ihrem Mittelwert dar.

$$\text{slanDCs bzw. pDCs/mm}^2 = \frac{\text{Anzahl slanDCs bzw. pDCs im HPF}}{\text{Größe des HPFs in } \mu\text{m}^2} \times 1.000.000$$

Anschließend wurden für das gesamte Patientenkollektiv das arithmetische Mittel, der Median, die erste und dritte Quartile und die Spannweite der ermittelten Zellanzahlen pro Quadratmillimeter errechnet.

Der prozentuale Anteil sowohl für slan als auch für das jeweilige Zytokin bzw. den jeweiligen Oberflächenmarker positiver Zellen (%slanDCs⁺⁺) wurde aus der Gesamtzahl der detektierten Zellen (slanDCs⁺) und der Anzahl der doppelt positiven Zellen (slanDCs⁺⁺) berechnet.

$$\% \text{slanDCs}^{++} = \frac{\text{slanDCs}^{++}}{\text{slanDCs}^{+}} \times 100$$

Auch hier erfolgte anschließend für die gefärbten Präparate je Zytokin bzw. Marker die Berechnung des arithmetischen Mittels und der Spannweite mithilfe von Microsoft Excel.

Zum Vergleich zweier unverbundener Gruppen, bei denen keine normalverteilte Grundgesamtheit angenommen werden konnte, wurde der Mann-Whitney U Test eingesetzt (Assoziation der Frequenz von infiltrierenden slanDCs mit der TNM-Klassifikation). Zur Signifikanztestung der Unterschiede zwischen Ergebnissen einer annähernd normalverteilten Grundgesamtheit wurde der t-Test nach Student durchgeführt (Vergleich slanDCs in Kolonkarzinom-Gewebe und tumorfreiem Gewebe und Vergleich der Frequenz von slanDCs und pDCs im Kolonkarzinom). Die Nullhypothese beschreibt dabei, dass kein Unterschied zwischen den untersuchten Werten besteht, wohingegen die Alternativhypothese von einer Ungleichheit ausgeht. Der p-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit dafür an, dass die Nullhypothese zutrifft. Bei allen Tests wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ angenommen und in den Abbildungen der Ergebnisse als signifikant (*) gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis von slanDCs in Kolonkarzinom-Geweben

Tumoren wachsen innerhalb eines hochvariablen Mikromilieus, umgeben von Blut- und Lymphgefäßen, Zytokinen, Chemokinen und infiltrierenden Immunzellen. Zu diesen zählen sowohl Zellen des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen, NK-Zellen, neutrophile Granulozyten und DCs als auch des erworbenen Immunsystems (T- und B-Lymphozyten) (Fridman et al., 2014). SlanDCs stellen eine vor kurzem beschriebene Subpopulation von DCs dar, welche bisher in Gewebeproben einiger entzündlicher Erkrankungen, wie z. B. Psoriasis, Lupus erythematodes oder GvHD, nachgewiesen werden konnte (Schäkel et al., 1998; Hänsel et al., 2011; Hänsel et al., 2013; Sommer et al., 2014). Ihre proinflammatorischen Eigenschaften könnten auch bei einer Tumor-gerichteten Immunantwort eine wichtige Rolle spielen (Schäkel et al., 2002; Schmitz et al., 2005; Schäkel et al., 2006; Wehner et al., 2011; Wehner et al., 2009). Vermi et al. wiesen eine Akkumulation von slanDCs in Tumor-drainierenden Lymphknotenmetastasen nach, in Primärtumoren wurde jedoch keine relevante Anzahl detektiert (Vermi et al., 2014). Kürzlich konnten Toma et al. jedoch den Nachweis für das Vorkommen von slanDCs in Geweben von Nierenzellkarzinomen erbringen (Toma et al., 2015).

Im Rahmen dieser Dissertation wurden 47 Kolonkarzinom-Gewebeproben auf eine Infiltration durch slanDCs untersucht und vergleichend die Frequenz von slanDCs in 38 korrespondierenden tumorfreen Kolon-Geweben analysiert. Beide Gewebeproben stammten dabei jeweils von derselben Person. Die entsprechenden tumorfreen Gewebe der neun übrigen Karzinom-Gewebeproben waren entweder nicht verfügbar oder aufgrund eines sehr unspezifischen Färbeverhaltens in der AP-Färbung nicht auswertbar. Die Detektion erfolgte, wie unter 2.2.2 beschrieben, durch eine immunhistochemische Färbung der slan-Struktur der DCs mit einer Maus Anti-human slan Antikörperlösung und dem EnVision™ G|2 Detektionssystem. Letzteres bewirkt eine Rot- oder Rosafärbung der entsprechenden Zellen mittels einer Substratumsetzung durch AP-gekoppelte Sekundärantikörper.

Interessanterweise konnten slanDCs in 46 von 47 Tumorgeweben (97,9 %) mit einem Mittelwert von 16,07 slanDCs/mm² und einer Spannweite von 0–40,79 slanDCs/mm² detektiert werden. Abbildung 3 zeigt eine repräsentative mikroskopische Aufnahme von slanDCs in einem der Kolonkarzinom-Gewebe. Der Median wurde mit 12,66 slanDCs/mm² errechnet. 25 % der Gewebeproben enthielten mehr als 22,5 slanDCs/mm² (oberes Quartil) und 75 % mehr als 8,44 slanDCs/mm² (unteres Quartil). Alle ermittelten Werte sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

In 37 der 38 Tumorgewebe (97,4 %) mit vorliegenden Ergebnissen von korrespondierenden tumorfreien Kolon-Gewebeproben konnten slanDCs detektiert werden und es ergab sich ein Mittelwert von 16,69 slanDCs/mm². Im Vergleich dazu wurden slanDCs in den tumorfreien Kolon-Abschnitten in 34 von 38 (89,5 %) untersuchten Gewebeproben nachgewiesen mit einem signifikant niedrigeren Mittelwert von 9,25 slanDCs/mm² (Abbildung 5). Ein repräsentatives Beispiel für slanDCs in tumorfreiem Kolon-Gewebe zeigt Abbildung 4. Tabelle 6 fasst die Einzelergebnisse der untersuchten tumorfreien Gewebe zusammen. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich erstmalig eine Akkumulation von slanDCs in Kolonkarzinom-Geweben zeigen.

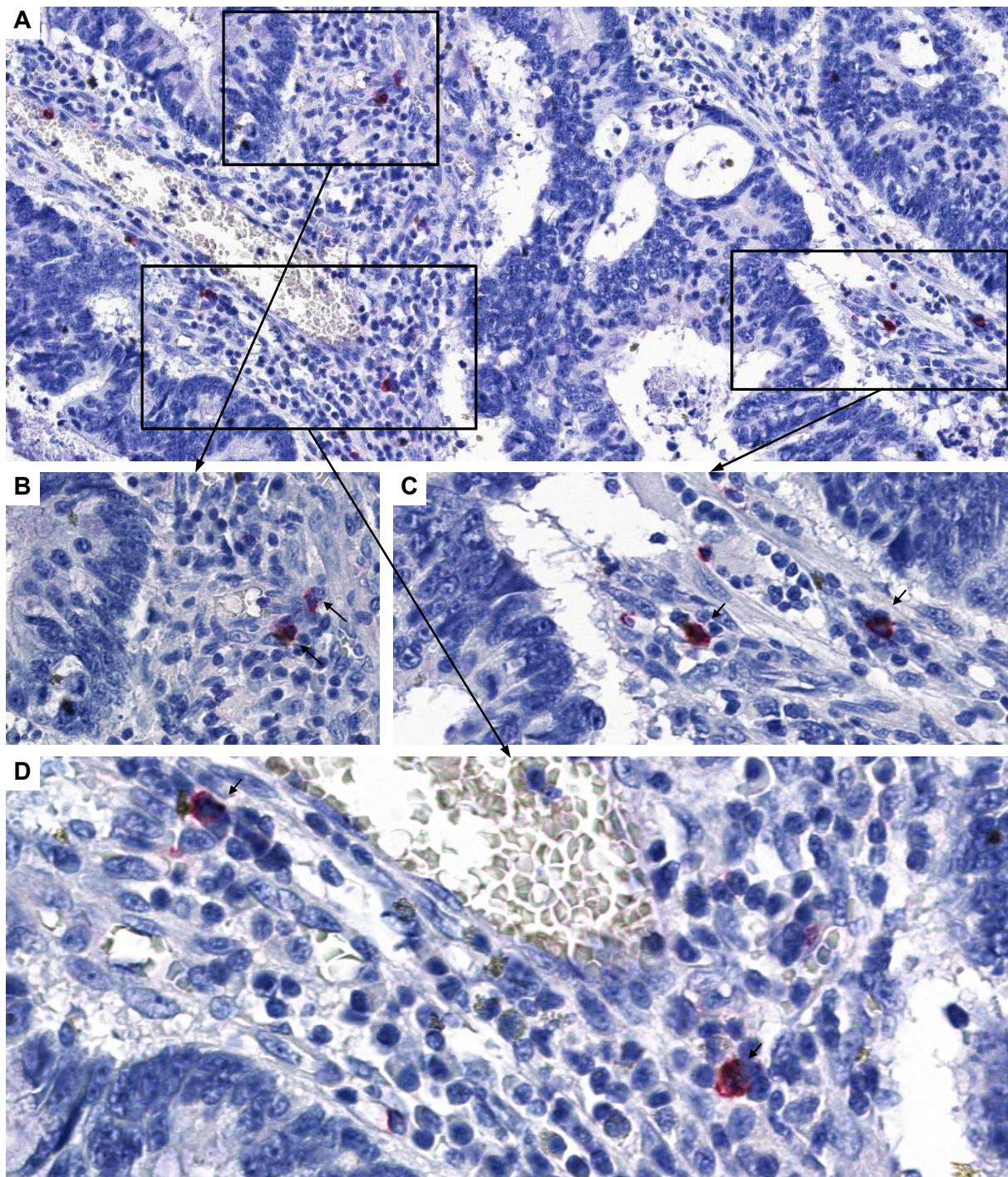


Abbildung 3: Detektion von slanDCs in Kolonkarzinom-Gewebe. Die Detektion von slanDCs in 47 Kolonkarzinom-Geweben erfolgte durch immunhistochemische Färbung mithilfe einer Maus Anti-human slan Antikörperlösung und dem EnVision™ G2 Detektionssystem. SlanDCs erscheinen rot gefärbt. Zur Darstellung der Zellkerne (blau) wurde eine Gegenfärbung mit Hämalaunlösung durchgeführt. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Beispiel für das Vorkommen mehrerer slanDCs (gekennzeichnet durch schwarze Pfeile in B, C und D) in Kolonkarzinom-Gewebe mit einer Übersichtsaufnahme (A – 100-fache originale Vergrößerung) und drei Detailansichten (B, C, D – 200-fache originale Vergrößerung).

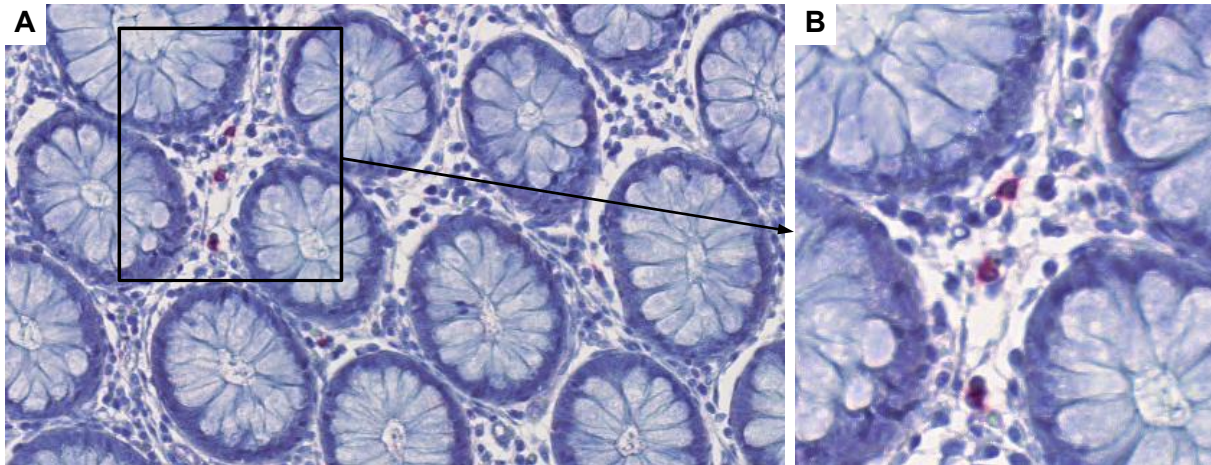


Abbildung 4: Immunhistochemischer Nachweis von slanDCs in tumorfreiem Kolon-Gewebe. Es erfolgte eine Detektion von slanDCs in 38 tumorfreien Kolon-Geweben mithilfe immunhistochemischer Färbungen mit einer Maus Anti-human slan Antikörperlösung und dem EnVision™ G|2 Detektionssystem. SlanDCs erscheinen rot gefärbt, die Zellkerne (blau) wurden durch eine Gegenfärbung mit Hämalaunlösung dargestellt. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Beispiel für das Auftreten einiger slanDCs in tumorfreiem Kolon-Gewebe mit einer Übersichtsaufnahme (**A** – 100-fache originale Vergrößerung) und einer Detailaufnahme (**B** – 200-fache originale Vergrößerung).

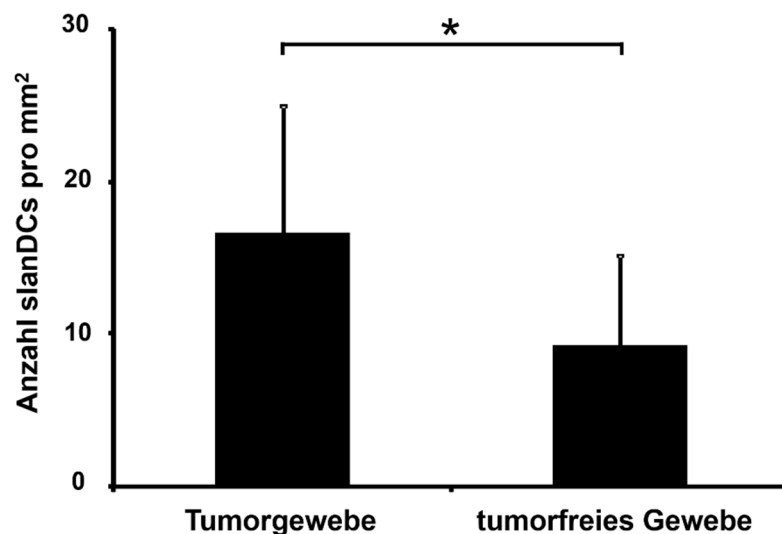


Abbildung 5: Frequenz infiltrierender slanDCs in Kolonkarzinom-Geweben im Vergleich zu tumorfreiem Kolon-Gewebe. Es erfolgte eine Auszählung der positiv gefärbten Zellen und die Anzahl der slanDCs pro Quadratmillimeter wurde ermittelt. Das Diagramm zeigt die Anzahl der slanDCs in Kolonkarzinom-Geweben (n=38) im Vergleich zu den korrespondierenden tumorfreien Kolon-Gewebeproben (n=38). Dargestellt sind der jeweilige Mittelwert der slanDCs in den Geweben ± die Mittelabweichung. Der Stern markiert einen statistisch signifikanten Unterschied der Ergebnisse mit $p < 0,05$.

Tabelle 5: Frequenz der infiltrierenden slanDCs in den 47 untersuchten Kolonkarzinom-Gewebeproben. Zur Ermittlung der Werte wurden die slanDCs in drei HPFs festgelegter Größe pro Gewebeprobe gezählt und anschließend auf Quadratmillimeter bezogen. Aus den erhaltenen Werten wurde der Mittelwert gebildet und die Mittelabweichung berechnet.

Gewebe-Nr.	Zählungen			Mittelwert	Mittelabweichung
	HPF 1	HPF 2	HPF 3		
	slanDCs/mm ²	slanDCs/mm ²	slanDCs/mm ²	slanDCs/mm ²	
1	16,88	12,66	8,44	12,66	2,81
2	29,54	25,32	16,88	23,91	4,69
3	21,10	42,19	42,19	35,16	9,38
4	29,54	16,88	16,88	21,10	5,63
5	0	0	0	0	0
6	25,32	12,66	16,88	18,28	4,69
7	8,44	8,44	4,22	7,03	1,88
8	12,66	8,44	8,44	9,85	1,88
9	16,88	12,66	8,44	12,66	2,81
10	12,66	12,66	16,88	14,06	1,88
11	16,88	12,66	4,22	11,25	4,69
12	25,32	8,44	12,66	15,47	6,56
13	16,88	16,88	12,66	15,47	1,88
14	29,54	29,54	21,10	26,72	3,75
15	8,44	8,44	8,44	8,44	0
16	25,32	25,32	16,88	22,50	3,75
17	25,32	29,54	21,10	25,32	2,81
18	21,10	29,54	16,88	22,50	4,69
19	12,66	8,44	4,22	8,44	2,81
20	12,66	16,88	4,22	11,25	4,69
21	21,10	8,44	4,22	11,25	6,56
22	33,76	25,32	25,32	28,13	3,75
23	8,44	4,22	4,22	5,63	1,88
24	25,32	12,66	12,66	16,88	5,63
25	42,19	25,32	29,54	32,35	6,56
26	12,66	16,88	12,66	14,06	1,88
27	21,10	21,10	12,66	18,28	3,75
28	12,66	4,22	4,22	7,03	3,75
29	21,10	12,66	25,32	19,69	4,69
30	42,19	25,32	29,54	32,35	6,56
31	21,10	4,22	4,22	9,85	7,50
32	37,97	29,54	16,88	28,13	7,50
33	8,44	4,22	4,22	5,63	1,88
34	8,44	8,44	8,44	8,44	0
35	8,44	4,22	4,22	5,63	1,88

Gewebe-Nr.	Zählungen			Mittelwert	Mittel- abweichung
	HPF 1	HPF 2	HPF 3		
	slanDCs/mm ²	slanDCs/mm ²	slanDCs/mm ²	slanDCs/mm ²	
36	16,88	8,44	8,44	11,25	3,75
37	8,44	12,66	8,44	9,85	1,88
38	8,44	12,66	8,44	9,85	1,88
39	12,66	8,44	8,44	9,85	1,88
40	8,44	4,22	4,22	5,63	1,88
41	12,66	8,44	4,22	8,44	2,81
42	8,44	12,66	4,22	8,44	2,81
43	33,76	12,66	12,66	19,69	9,38
44	16,88	8,44	8,44	11,25	3,75
45	46,41	42,19	33,76	40,79	4,69
46	25,32	25,32	29,54	26,72	1,88
47	29,54	29,54	25,32	28,13	1,88

Tabelle 6: Frequenz der infiltrierenden slanDCs in den 38 vergleichend analysierten korrespondierenden tumorfreen Kolon-Geweben. Zur Ermittlung der Werte wurden die slanDCs in drei HPFs festgelegter Größe pro Gewebeprobe gezählt und anschließend auf Quadratmillimeter bezogen. Aus den erhaltenen Werten wurde der Mittelwert gebildet und die Mittelabweichung berechnet.

Gewebe-Nr.	Zählungen			Mittelwert	Mittel- abweichung
	HPF 1	HPF 2	HPF 3		
	slanDCs/mm ²	slanDCs/mm ²	slanDCs/mm ²	slanDCs/mm ²	
1	21,10	12,66	12,66	15,47	3,75
2	4,22	4,22	4,22	4,22	0
3	29,54	16,88	12,66	19,69	6,56
4	4,22	4,22	4,22	4,22	0
5	12,66	21,10	4,22	12,66	5,63
6	8,44	8,44	4,22	7,03	1,88
7	0	0	0	0	0
8	4,22	4,22	4,22	4,22	0
9					
10	16,88	16,88	12,66	15,47	1,88
11					
12	4,22	4,22	0	2,81	1,88
13	4,22	4,22	4,22	4,22	0
14	12,66	12,66	12,66	12,66	0
15	8,44	4,22	4,22	5,63	1,88
16					

Gewebe-Nr.	Zählungen			Mittelwert	Mittel- abweichung
	HPF 1	HPF 2	HPF 3		
	slanDCs/mm ²	slanDCs/mm ²	slanDCs/mm ²	slanDCs/mm ²	
17	0	0	0	0	0
18	16,88	12,66	12,66	14,06	1,88
19	4,22	0	0	1,41	1,88
20	8,44	4,22	4,22	5,63	1,88
21					
22	4,22	4,22	0	2,81	1,88
23	8,44	4,22	0	4,22	2,81
24	29,54	8,44	8,44	15,47	9,38
25	33,76	29,54	29,54	30,94	1,88
26	16,88	12,66	12,66	14,06	1,88
27	12,66	12,66	8,44	11,25	1,88
28	4,22	4,22	4,22	4,22	0
29					
30	8,44	8,44	4,22	7,03	1,88
31					
32	8,44	8,44	4,22	7,03	1,88
33	21,10	21,10	12,66	18,28	3,75
34	0	0	0	0	0
35	12,66	4,22	4,22	7,03	3,75
36	8,44	4,22	4,22	5,63	1,88
37	21,10	8,44	8,44	12,66	5,63
38	29,54	25,32	25,32	26,72	1,88
39	12,66	8,44	8,44	9,85	1,88
40					
41					
42	0	0	0	0	0
43					
44	8,44	4,22	4,22	5,63	1,88
45	12,66	4,22	4,22	7,03	3,75
46	25,32	21,10	16,88	21,10	2,81
47	16,88	8,44	8,44	11,25	3,75

3.2 Assoziation der ermittelten Frequenz infiltrierender slanDCs mit der TNM-Klassifikation des Kolonkarzinoms

Bisher liegen in der Literatur verschiedene und zum Teil widersprüchliche Ergebnisse sowohl zu der allgemeinen Bedeutung von DCs in Tumorerkrankungen als auch zu ihrer Rolle im KRK vor (Karthaus et al., 2012). In Geweben von klarzelligen Nierenzellkarzinomen wurde eine

hohe Dichte infiltrierender slanDCs mit einem höheren T-Stadium des Primärtumors und mit einem Vorliegen von Lymphknotenmetastasen zum Zeitpunkt der Nephrektomie assoziiert. Des Weiteren wurden signifikant höhere Infiltrationsraten mit slanDCs in den Primärtumoren von Erkrankten mit Fernmetastasen detektiert (Toma et al., 2015).

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Frequenz infiltrierender slanDCs im Tumorgewebe mit klinisch-pathologischen Charakteristika der Kolonkarzinom-Erkrankten assoziiert. Dabei wurde insbesondere ein möglicher Zusammenhang zwischen Tumorgroße (T-Stadium des Primärtumors) bzw. vorliegenden Lymphknotenmetastasen zum Zeitpunkt der Kolektomie und Infiltrationsdichte der slanDCs untersucht.

Im vorliegenden Kollektiv lässt sich eine signifikant verminderte Infiltration mit slanDCs im Stadium T3 des Primärtumors im Vergleich zu T1 oder T2 klassifizierten Tumoren nachweisen (Abbildung 6). Die Infiltrationsdichte der slanDCs der Kolonkarzinome von Erkrankten mit vorliegenden Lymphknotenmetastasen zum Zeitpunkt der Tumorresektion zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied zu Erkrankten ohne Lymphknotenmetastasen (Abbildung 7).

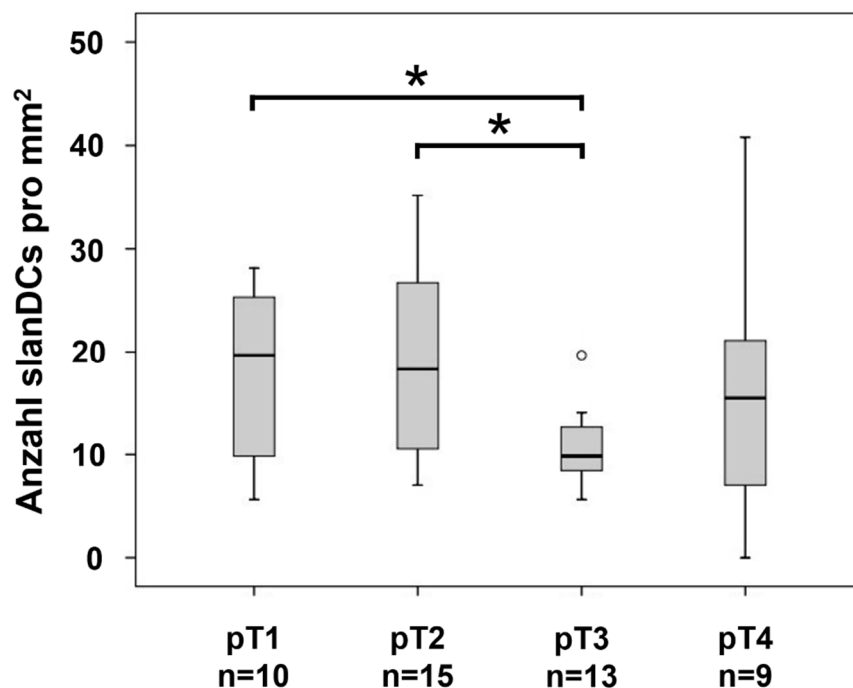


Abbildung 6: Assoziation der Anzahl der slanDCs in Kolonkarzinom-Geweben mit dem T-Stadium des Primärtumors. Die Boxplots zeigen die Assoziation zwischen Anzahl der slanDCs im Tumorgewebe und T-Stadium des Tumors. Die Kästen stellen den Bereich zwischen oberer und unterer Quartile dar, die Medianwerte sind als horizontale Linien abgebildet. Die Länge der Antennen (Whisker) beträgt das 1,5-fache des Interquartilsabstands. Die Kreise bilden Werte größer des 1,5-fachen Interquartilsabstands ab. Statistische signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ von Ergebnissen sind mit einem Stern gekennzeichnet.

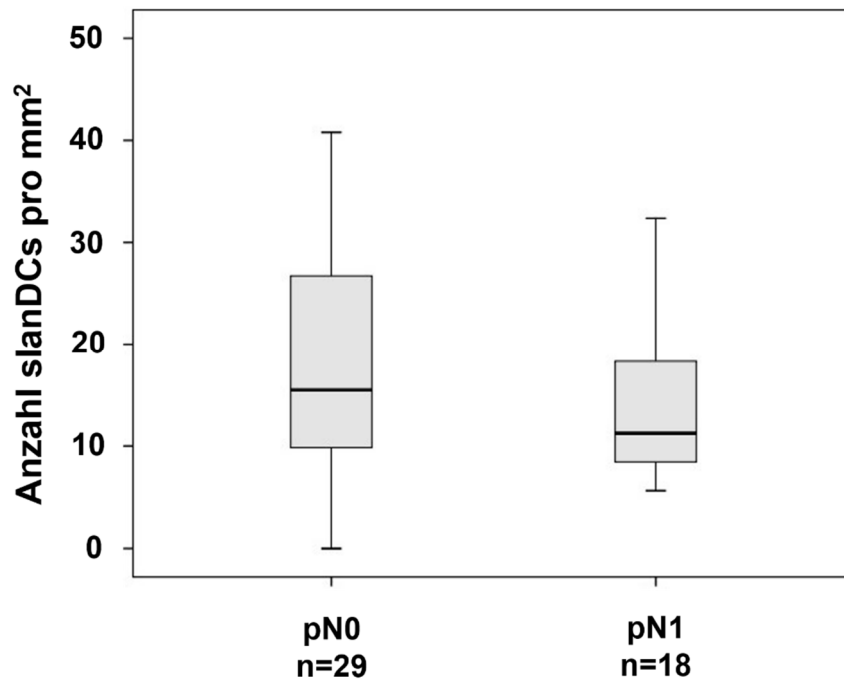


Abbildung 7: Assoziation der Anzahl der slanDCs in Kolonkarzinom-Geweben mit dem Lymphknotenstatus bei Diagnosestellung. Die Boxplots zeigen die Assoziation zwischen Frequenz der slanDCs im Tumorgewebe und dem Lymphknotenstatus der Erkrankten. Die Kästen bilden den Bereich zwischen oberer und unterer Quartile ab, die Medianwerte sind darin als horizontale Linien dargestellt. Die Antennen (Whisker) markieren das 1,5-fache des Interquartilsabstands.

3.3 Nachweis von pDCs in Kolonkarzinom-Geweben

PDCs besitzen die Fähigkeit der Sekretion großer Mengen Typ-I-IFN und sind auf die Detektion viraler DNA durch die Expression der TLRs 7 und 9 spezialisiert (Siegal et al., 1999; Lande und Gilliet, 2010). Diesem DC-Subtyp wird jedoch nicht nur eine wichtige Rolle in der Bekämpfung von Virusinfektionen des Körpers zugesprochen, sondern auch eine Bedeutung in verschiedenen Tumorerkrankungen ist derzeit Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. PDCs könnten eine Tumor-gerichtete Immunantwort durch Kreuzpräsentation von Tumorantigenen zu CD8⁺ T-Lymphozyten induzieren und die Interaktion zwischen Tumorzellen und Immunsystem durch die Sekretion von Typ-I-IFN modulieren (Vermi et al., 2011). Einige Untersuchungen deuten jedoch auch auf eine Bedeutung von pDCs in der Vermittlung von Toleranz gegenüber Tumorzellen hin. Mögliche Ursachen dafür stellen eine Blockierung Tumor-gerichteter Effekte von pDCs durch Komponenten der Tumor-Mikroumgebung oder die Induktion von T_{regs} dar. Die Zellen konnten bisher beim Melanom, einigen hämatologischen Tumorentitäten und verschiedenen primären Karzinomen (z. B. Prostatakarzinom, Mammakarzinom oder Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome) nachgewiesen werden. Auch in Tumor-drainierenden Lymphknoten wurden die Zellen detektiert (Vermi et al., 2011).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Kolonkarzinome mithilfe von Anti-human CD303 Antikörpern auf ihre Frequenz von infiltrierenden pDCs untersucht und diese mit der Infiltration der Tumoren durch slanDCs verglichen. Dafür wurde eine immunhistochemische Färbung des Oberflächenmarkers CD303 an 20 Kolonkarzinom-Präparaten vorgenommen und es erfolgte eine anschließende Detektion der Zellen mithilfe des EnVision™ G|2 Detektionssystems mit Rotfärbung der pDCs durch eine AP-Reaktion (siehe unter 2.2.2).

In 14 von 20 Präparaten (70 %) ließen sich pDCs nachweisen (Abbildung 9) mit einem Mittelwert von 4,86 pDCs/mm² und einer Spannweite von 0–18,28 pDCs/mm². Alle ermittelten Werte sind in Tabelle 7 zusammengefasst. SlanDCs hingegen wurden in allen der 20 Präparate detektiert und diese DC-Subpopulation war mit 18,85 slanDCs/mm² in einer signifikant höheren Frequenz in den Kolonkarzinom-Geweben zu finden als die Population der pDCs (Abbildung 8). Diese Ergebnisse weisen auf eine Präsenz von pDCs im Kolonkarzinom hin, jedoch in einer deutlich niedrigeren Frequenz als slanDCs.

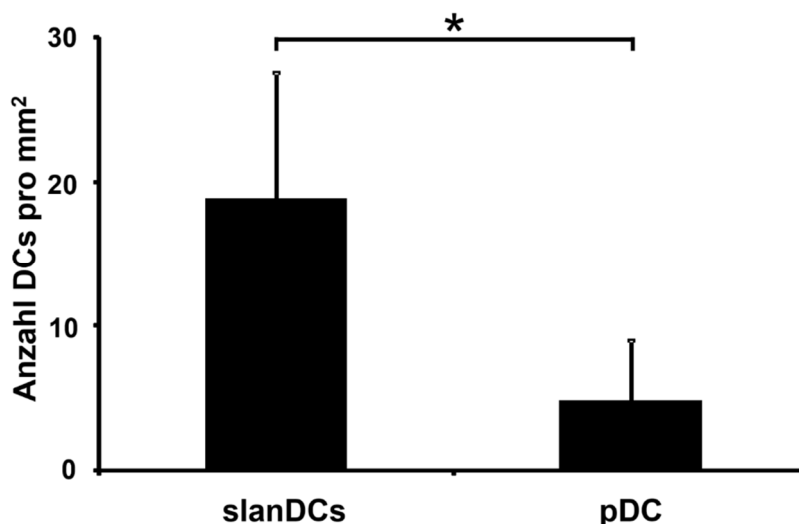


Abbildung 8: Frequenz infiltrierender slanDCs und pDCs in Kolonkarzinom-Geweben im Vergleich. Positiv gefärbte Zellen wurden ausgezählt und die Anzahl der slanDCs und pDCs pro Quadratmillimeter ermittelt. Das Diagramm zeigt einen Vergleich der Anzahl der slanDCs und pDCs in Kolonkarzinom-Geweben (n=20). Dargestellt sind der Mittelwert der DCs in den Geweben \pm die Mittelabweichung. Der Stern markiert einen statistisch signifikanten Unterschied der Ergebnisse mit $p < 0,05$.

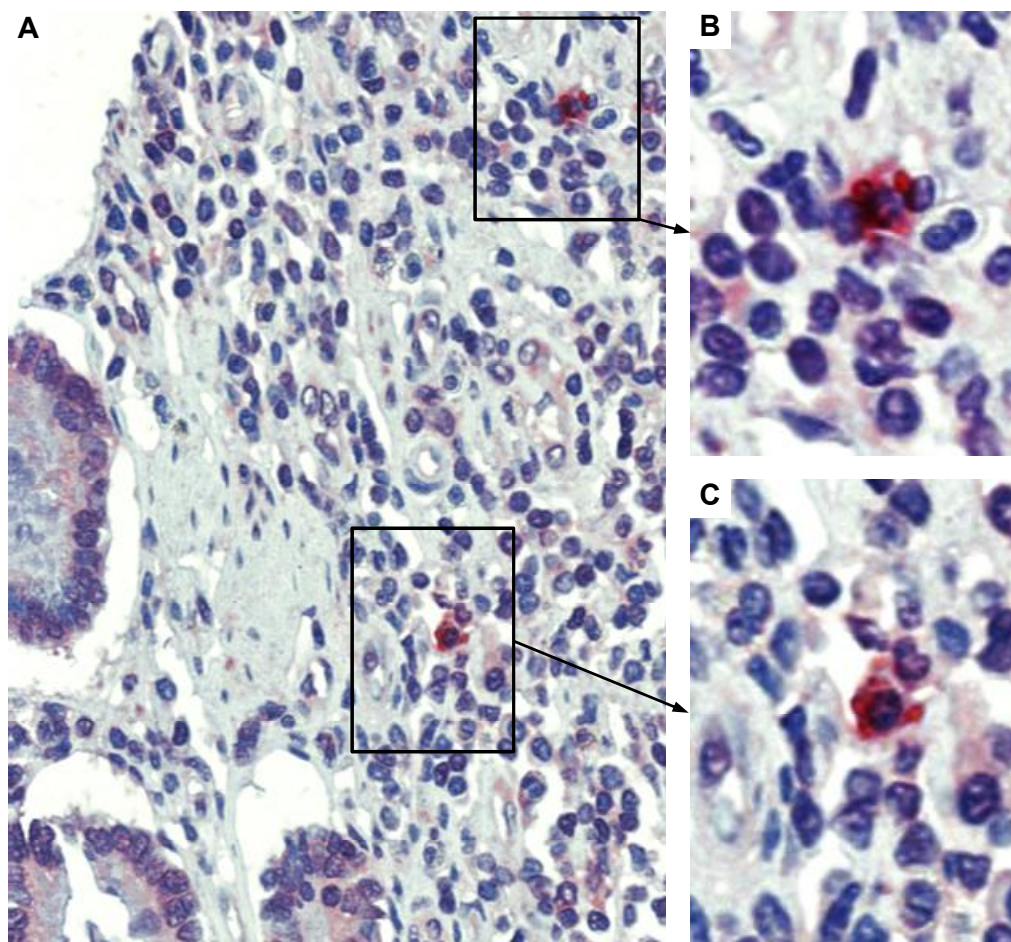


Abbildung 9: Immunhistochemischer Nachweis von pDCs in Kolonkarzinom-Gewebe. Es erfolgte eine Detektion von pDCs in 20 Kolonkarzinom-Geweben durch immunhistochemische Färbung mithilfe von Maus Anti-human CD303 Antikörpern und dem EnVision™ G2 Kit, welches die pDCs durch eine AP-Reaktion rot darstellt. Die Zellkerne wurden durch eine Gegenfärbung mit Hämalaunlösung blau gefärbt. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Beispiel für zwei pDCs in Kolonkarzinom-Gewebe mit einer Übersichtsaufnahme (**A** – 200-fache originale Vergrößerung) und zwei Detailausschnitten (**B**, **C** – 400-fache originale Vergrößerung).

Tabelle 7: Frequenz der infiltrierenden pDCs in den 20 untersuchten Kolonkarzinom-Gewebeproben. Zur Ermittlung der Werte wurden die pDCs in drei HPFs festgelegter Größe pro Gewebeprobe gezählt und anschließend auf Quadratmillimeter bezogen. Aus den erhaltenen Werten wurde der Mittelwert gebildet und Mittelabweichung berechnet.

Gewebe-Nr.	Zählungen			Mittelwert	Mittelabweichung
	HPF 1	HPF 2	HPF 3		
	pDCs/mm ²	pDCs/mm ²	pDCs/mm ²	pDCs/mm ²	
1	16,81	4,18	4,26	8,42	5,59
2	4,22	0,24	0	1,49	1,82
3	16,74	8,33	2,38	9,15	5,06
4	20,92	8,33	16,74	15,33	4,66
5	0	0	0	0	0

6	16,67	4,17	4,20	8,35	5,55
7	4,17	4,18	0	2,78	1,86
8	0	0	0	0	0
9	4,18	4,18	0	2,79	1,86
10	4,17	4,17	4,17	4,17	0
11	4,17	4,17	0	2,78	1,85
12	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0
14	21,19	16,74	16,67	18,20	1,99
15	0	0	0	0	0
16	12,50	4,17	4,18	6,95	3,70
17	8,37	0	0	2,79	3,72
18	12,55	4,20	4,17	6,97	3,72
19	0	0	0	0	0
20	8,40	8,33	0	5,58	3,72

3.4 Expression von CD83 durch slanDCs in Kolonkarzinom-Gewebe

Reife DCs sind in der Lage, sowohl eine naive T-Zell-Antwort zu generieren als auch Effektor-T-Lymphozyten zu aktivieren. Während ihrer Ausreifung erfolgen funktionelle und phänotypische Veränderungen, u. a. eine verstärkte Expression kostimulatorischer Moleküle wie CD80, CD86 und CD40 (Reis e Sousa, 2006; Sabbat  et al., 2007). Auch der Oberflächenmarker CD83, ein Glykoprotein der Immunglobulin-Superfamilie, wird vermehrt exprimiert und findet daher häufig zur Detektion reifer DCs im Blut oder im Gewebe Anwendung (Zhou und Tedder, 1995; Lechmann et al., 2002). Frisch aus dem Blut isolierte slanDCs weisen einen unreifen Phänotyp auf, beginnen jedoch *in vitro* sofort auszureifen und exprimieren infolgedessen vermehrt CD83, HLA-DR, CD40 und CD86 auf ihrer Oberfläche. Im Blut wird dieser Maturierungsvorgang durch CD47 auf Erythrozyten verhindert, ein Oberflächenmolekül, das mit dem inhibitorischen Rezeptor „signal regulatory protein α “ auf den slanDCs interagiert (Schäkel et al., 2006). Kürzlich wurden in frisch operierten Geweben von Nierenzellkarzinomen slanDCs mit unreifem Phänotyp nachgewiesen, welche kein CD83 auf ihrer Oberfläche exprimieren (Toma et al., 2015).

Um den Reifezustand der slanDCs in Kolonkarzinom-Gewebe zu untersuchen, wurde eine Doppelfärbung mit einer Maus Anti-human slan Antikörperlösung und Maus Anti-human CD83 Antikörpern an zehn Kolonkarzinom-Präparaten vorgenommen, wie unter 2.2.4 beschrieben. Diese wurden anhand der vorangegangenen AP-Färbung aufgrund eines dichten Infiltrats mit slanDCs ausgewählt. Die bindenden Sekundärantikörper bzw. das zugegebene Streptavidin waren mit zwei unterschiedlichen Fluorochromen gekoppelt und ermöglichten die Auswertung

unter einem Fluoreszenzmikroskop, wo der prozentuale Anteil CD83-exprimierender slanDCs ermittelt wurde.

In allen zehn untersuchten Präparaten konnte eine CD83 Expression durch slanDCs nachgewiesen werden (Abbildung 10). Als Mittelwert für die gleichzeitige Expression der slan-Struktur und des Oberflächenmarkers CD83 wurden 46,7 % errechnet mit variablen Frequenzen zwischen 6,5 % und 90 %. Die Einzelergebnisse aller untersuchten Gewebeproben können Abbildung 11 entnommen werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ca. die Hälfte der slanDCs im Kolonkarzinom einen reifen Phänotyp aufweist.

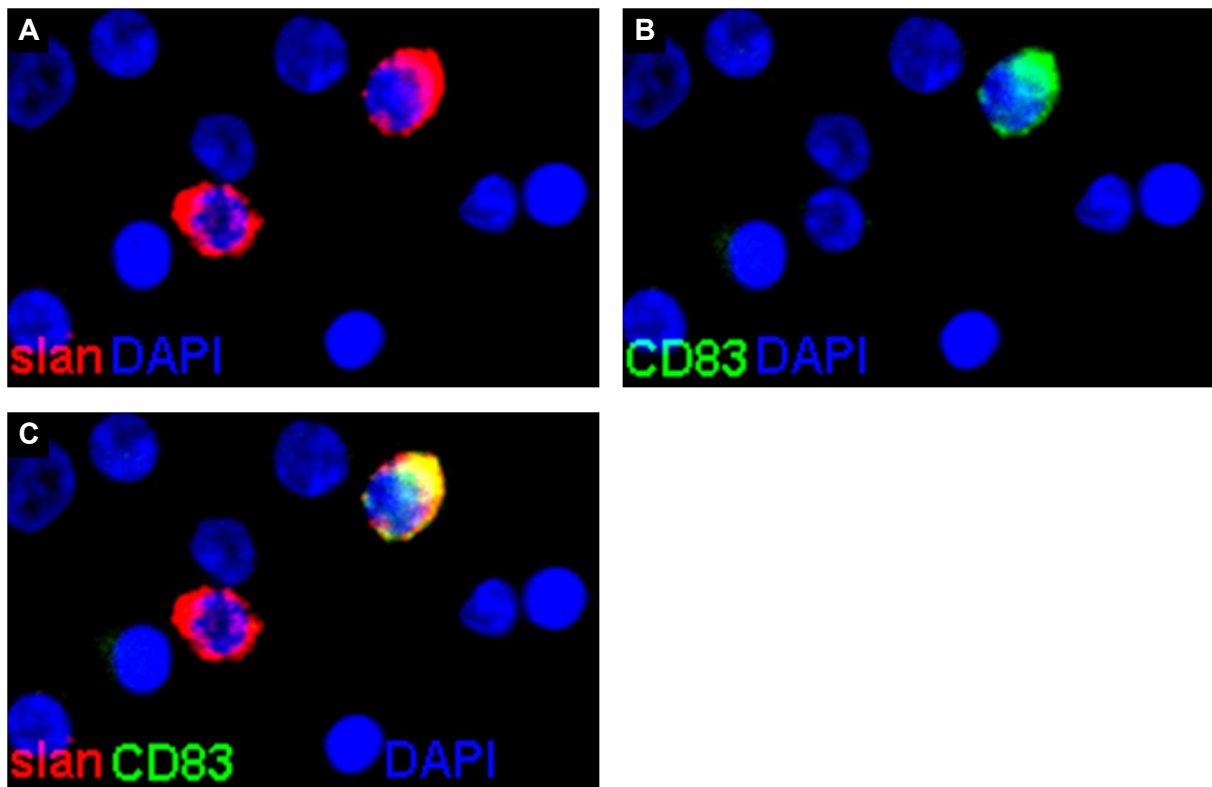


Abbildung 10: Nachweis einer CD83-exprimierenden slanDC in Kolonkarzinom-Gewebe. Es wurde eine Fluoreszenz-Doppelfärbung zur Darstellung von CD83⁺ slanDCs mit Anti-slan Antikörpern, Anti-CD83 Antikörpern und fluorchromgekoppelten Detektionsreagenzien durchgeführt. Die Aufnahmen erfolgten bei 200-facher originaler Vergrößerung. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Beispiel mit Darstellung einer einfach positiven slanDC und einer doppel positiven CD83⁺ slanDC (**A** – slanDCs (rot), **B** – CD83⁺ Zellen (grün), **C** – Overlay von A und B mit einer doppel positiven Zelle in gelb (CD83-exprimierende slanDC)). Die Färbung der Zellkerne (blau) erfolgte mit DAPI.

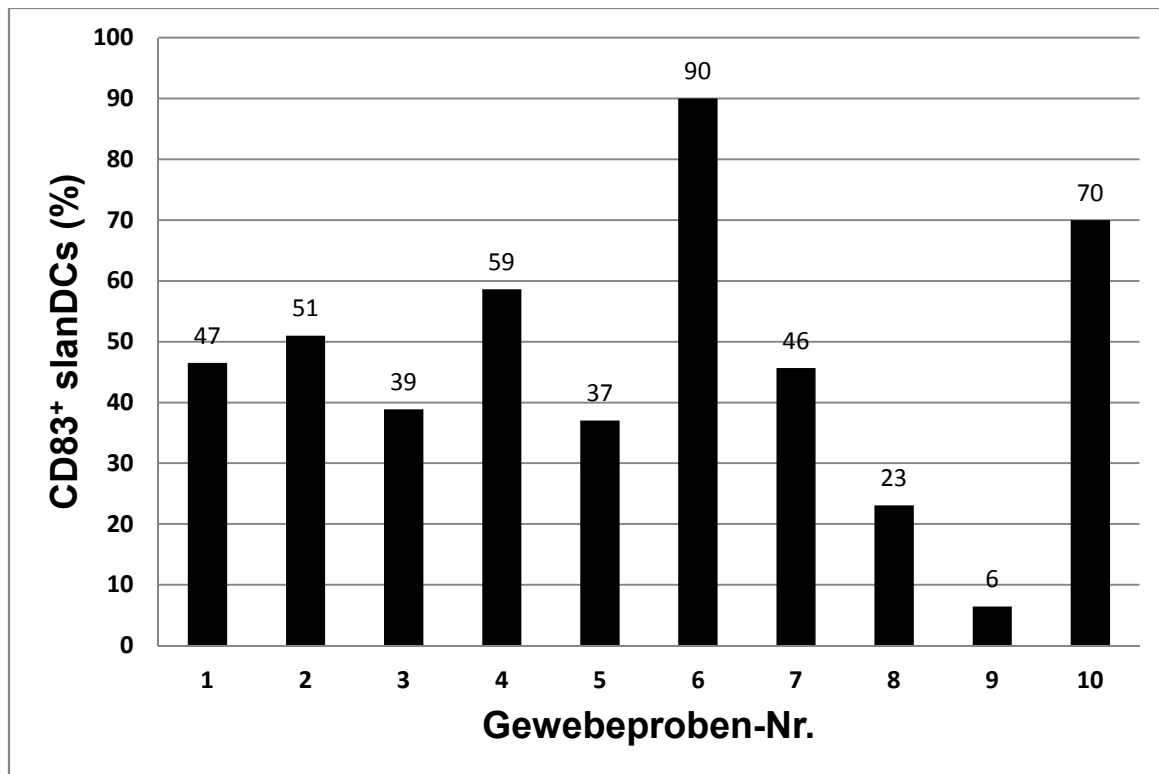


Abbildung 11: Prozentualer Anteil von CD83-exprimierenden slanDCs in Kolonkarzinom-Geweben. Zum Nachweis einer CD83-Expression durch slanDCs erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung von zehn Kolonkarzinom-Gewebeproben mit Anti-CD83 Antikörpern, Anti-slan Antikörpern und fluorochromgekoppelten Detektionsreagenzien. Das Diagramm bildet die Einzelergebnisse der CD83-Expression durch slanDCs in den untersuchten Gewebeproben ab. Die Säulen stellen den prozentualen Anteil der CD83-exprimierenden slanDCs an der Gesamtzahl der ausgezählten slanDCs in der jeweiligen Gewebeprobe dar.

3.5 Expression von Interleukin-23 durch slanDCs in Kolonkarzinom-Geweben

Aktivierte slanDCs sind in der Lage, das proinflammatorische Zytokin IL-23 zu produzieren (Hänsel et al., 2011; Hänsel et al., 2013; Sommer et al., 2014). Diesem Zytokin wird eine Rolle in der Progression von Tumorerkrankungen zugeschrieben, u. a. aufgrund seiner funktionellen Kapazität, CD4⁺ T-Lymphozyten zu T_H17-Zellen zu programmieren (Langrish et al., 2005; Kortylewski et al., 2009). Hänsel et al. zeigten in Immunfluoreszenzfärbungen die Expression von IL-23 durch slanDCs in psoriatisch veränderten Hautarealen (Hänsel et al., 2011). Auch bei der Autoimmunkrankheit Lupus erythematoses wurde die Produktion dieses Zytokins durch slanDCs nachgewiesen (Hänsel et al., 2013). Durch Sommer et al. wurden IL-23-exprimierende slanDCs zudem im Darmgewebe in Fällen von akuter GvHD nach allogener Stammzelltransplantation detektiert (Sommer et al., 2014).

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde nun evaluiert, ob auch slanDCs im Kolonkarzinom IL-23 exprimieren. Dafür wurde eine Immunfluoreszenzfärbung an elf Kolonkarzinom-Geweben vorgenommen. Es wurden Präparate ausgewählt, die in der AP-Färbung eine hohe

Infiltrationsrate mit slanDCs aufwiesen. Die Detektion erfolgte als Doppelfärbung, wie unter 2.2.3 beschrieben, mithilfe von Kaninchen Anti-human IL-23 Antikörpern, Anti-human slan Antikörpern und fluorochromgekoppelten Detektionsreagenzien. Es wurden mind. 20 slanDCs pro Präparat gezählt und der prozentuale Anteil der IL-23-exprimierenden slanDCs ermittelt.

In zehn von elf Präparaten (90,9 %) konnte eine IL-23-Expression durch slanDCs nachgewiesen werden (Abbildung 12). Der Anteil der Zytokin-exprimierenden slanDCs erstreckte sich zwischen 0 % und 52,4 % mit einem Mittelwert von 33,8 %. In acht der elf Präparate exprimierten mehr als 30 % der infiltrierenden slanDCs IL-23. Die Einzelergebnisse für die Gewebe können Abbildung 13 entnommen werden. Diese Untersuchungen verdeutlichen, dass ein Teil der slanDCs in Kolonkarzinom-Geweben das Zytokin IL-23 exprimiert.

Des Weiteren wurde mithilfe der gleichen Methodik untersucht, ob auch slanDCs in tumorfreien Kolon-Geweben IL-23 exprimieren. In fünf von sieben untersuchten tumorfreien Proben wurde eine deutlich niedrigere Dichte von IL-23⁺ slanDCs als in den korrespondierenden Kolonkarzinom-Geweben nachgewiesen (Abbildung 13).

Zusätzlich wurde anhand von fünf Proben gezeigt, dass slanDCs einen deutlichen Anteil an allen IL-23-exprimierenden Zellen in Kolonkarzinom-Geweben darstellen. Im Durchschnitt waren 59,9 % der IL-23⁺ Zellen slanDCs (Spannweite: 30,8–85,2 %), Abbildung 14 zeigt die Einzelergebnisse der untersuchten Präparate.

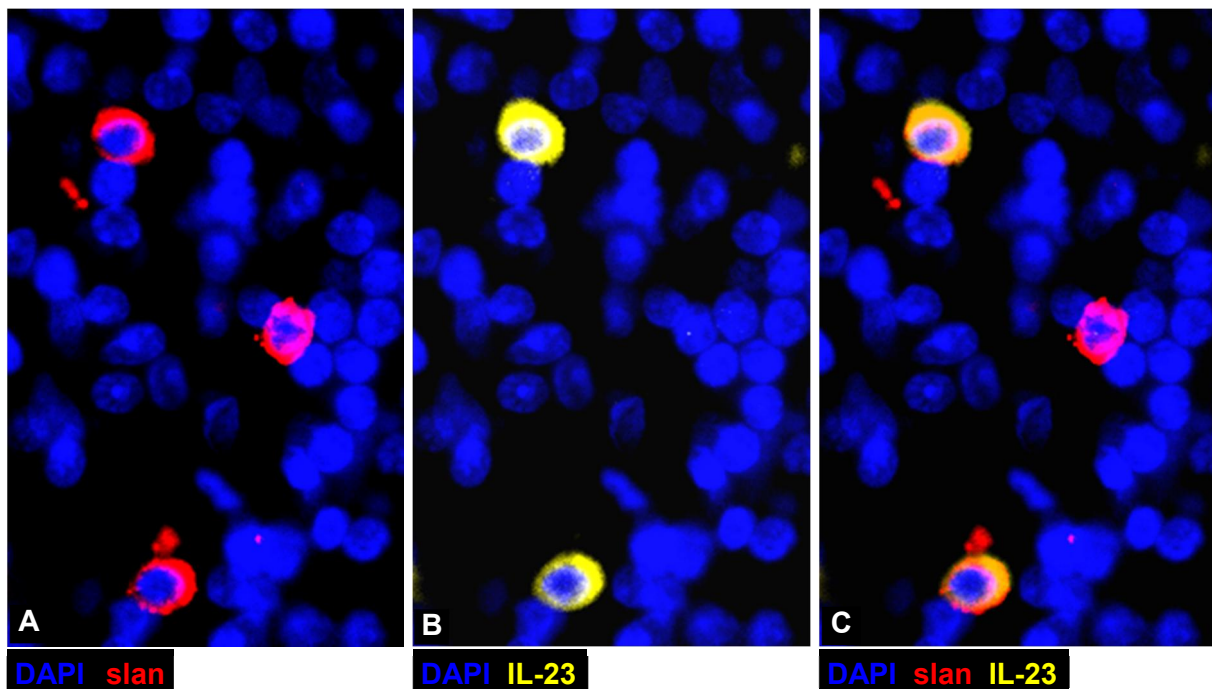


Abbildung 12: Nachweis von IL-23-exprimierenden slanDCs in Kolonkarzinom-Gewebe. IL-23⁺ slanDCs wurden durch eine Fluoreszenz-Doppelfärbung mit Anti-slan Antikörpern und Anti-IL-23 Antikörpern dargestellt. Fluorochromgekoppelte Detektionsreagenzien erlaubten die fluoreszenzmikroskopische Auswertung.

Die Aufnahmen erfolgten bei 200-facher Vergrößerung. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Beispiel mit zwei IL-23-exprimierenden slanDCs und einer einfach positiven slanDC (A – slanDCs (rot), B – IL-23⁺ Zellen (gelb), C – Overlay aus A und B, doppelt positive Zellen (IL-23-exprimierende slanDCs) erscheinen orange). Eine Färbung der Zellkerne (blau) erfolgte mit DAPI.

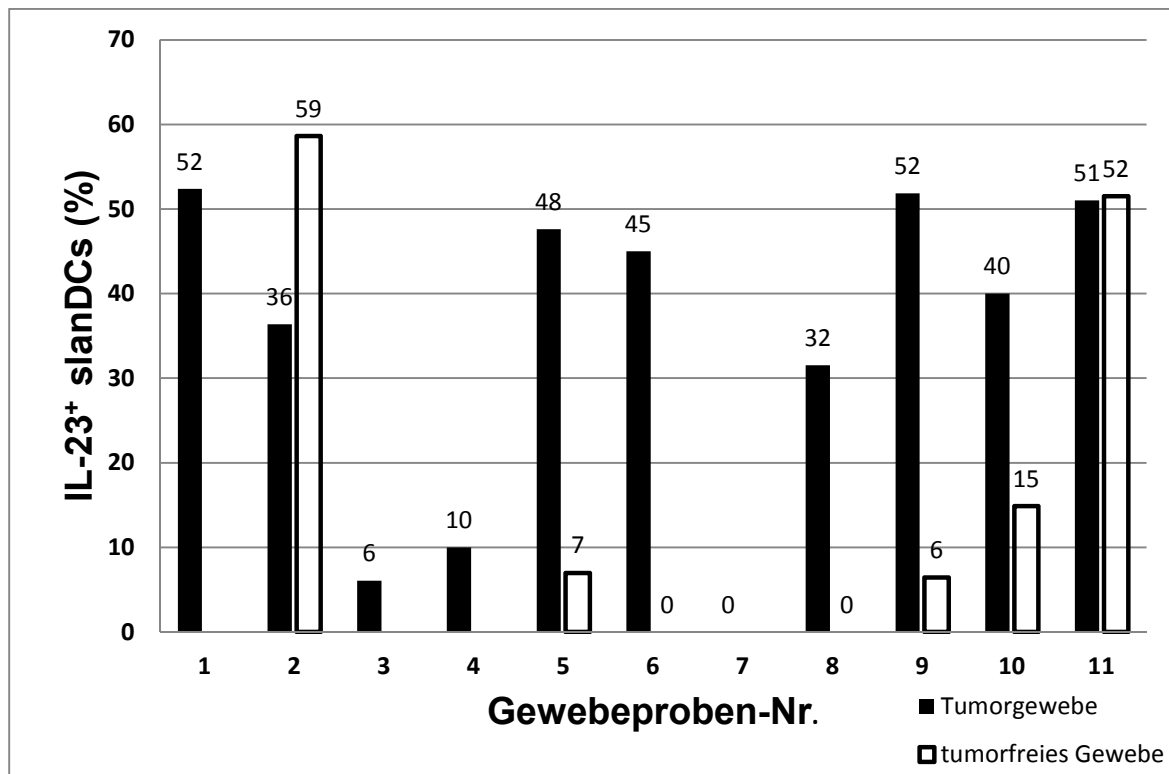


Abbildung 13: Prozentualer Anteil von IL-23-exprimierenden slanDCs in Kolonkarzinom-Geweben und tumorfreien Kolon-Geweben. Die IL-23⁺ slanDCs wurden durch eine Immunfluoreszenzfärbung in elf Kolonkarzinom-Gewebeproben und sieben tumorfreien Kolon-Geweben mit Anti-IL-23 Antikörpern, Anti-slan Antikörpern und fluorochrommarkierten Reagenzien detektiert und ausgezählt. Das Diagramm stellt die IL-23-Expression durch slanDCs in den einzelnen untersuchten Gewebeproben dar. Die Säulen geben den prozentualen Anteil von IL-23-exprimierenden slanDCs an allen gezählten slanDCs einer Gewebeprobe an.

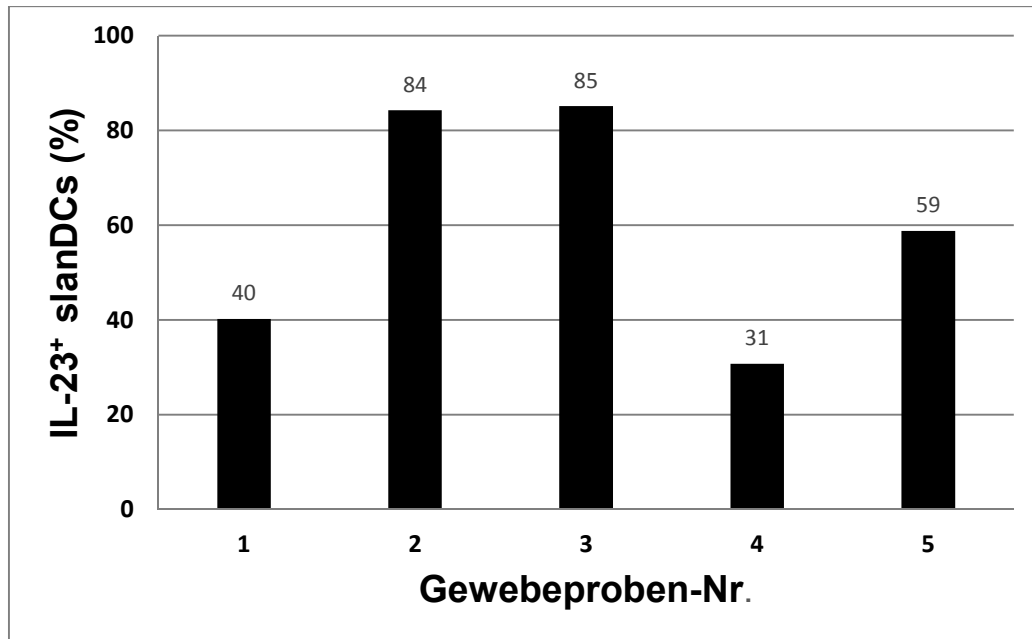


Abbildung 14: Prozentualer Anteil von IL-23-exprimierenden slanDCs an allen IL-23⁺ Zellen in Kolonkarzinom-Gewebe. Es erfolgte eine Detektion von IL-23⁺ slanDCs in fünf Kolonkarzinom-Gewebeproben durch Immunfluoreszenzfärbungen mit Anti-IL-23 Antikörpern, Anti-slan Antikörpern und fluorochrommarkierten Sekundärantikörpern bzw. fluorochrommarkiertem Streptavidin. Das Diagramm stellt die IL-23-Expression durch slanDCs der einzelnen untersuchten Gewebeproben dar. Die Säulen geben den prozentualen Anteil von IL-23-exprimierenden slanDCs an allen gezählten IL-23⁺ Zellen einer Gewebeprobe an.

3.6 Expression von Tumornekrosefaktor- α durch slanDCs in Kolonkarzinom-Gewebe

Das Zytokin TNF- α ist ein Protein, welches vor allem von Makrophagen, DCs, Lymphozyten und Mastzellen produziert wird und entweder auf der Oberfläche dieser Zellen als Homotrimer vorliegt oder als löslicher Faktor freigesetzt wird (Hehlhans und Pfeffer, 2005). TNF- α fördert Entzündungsreaktionen durch das Anlocken von Immunzellen und reguliert die lokale Blutgerinnung im Rahmen entzündlicher Geschehen. Das Zytokin wirkt zudem aktivierend auf Makrophagen und DCs und ist an der Entstehung von Fieber beteiligt (Waters et al., 2013b). Nach derzeitigen Erkenntnissen kann TNF- α sowohl das Wachstum von Tumoren fördern als auch verschiedene Zelltodformen in Tumorzellen wie Apoptose, Nekroptose oder Autophagie induzieren (Waters et al., 2013a).

In mehreren Publikationen konnte bisher eine TNF- α Produktion durch slanDCs nachgewiesen werden, sowohl *in vitro* als auch mithilfe immunhistochemischer Färbungen in Gewebeschnitten (Schäkel et al., 2002; Hänsel et al., 2011; Hänsel et al., 2013; Sommer et al., 2014). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob auch slanDCs im Kolonkarzinom die Fähigkeit besitzen, dieses proinflammatorische Zytokin zu exprimieren.

Dafür wurde eine Immunfluoreszenzfärbung, wie unter 2.2.3 beschrieben, von 13 Kolonkarzinom-Geweben vorgenommen, welche sich in der AP-Färbung durch eine dichte Infiltration mit slanDCs ausgezeichnet hatten. Die Detektion der Zytokin-exprimierenden Zellen erfolgte mit einer Doppelfärbung von TNF- α und slan. Fluorochromgekoppelte Sekundärantikörper bzw. fluorochromgekoppeltes Streptavidin erlaubten die Auswertung unter dem Mikroskop. Es wurde der prozentuale Anteil der TNF- α -exprimierenden slanDCs ermittelt.

Eine TNF- α Produktion durch slanDCs konnte in neun von 13 untersuchten Präparaten (69,2 %) nachgewiesen werden (Abbildung 15). Der Mittelwert betrug 11,1 % und die Spannweite erstreckte sich zwischen 0 % und 39,5 % Expression. Die Einzelergebnisse für die Gewebe zeigt Abbildung 16. Diese Untersuchungen zeigen, dass nur ein geringer Teil der slanDCs im Kolonkarzinom das Zytokin TNF- α exprimiert.

Abbildung 17 zeigt eine Gegenüberstellung der Expression von CD83, IL-23 und TNF- α durch slanDCs in den untersuchten Kolonkarzinom-Geweben.

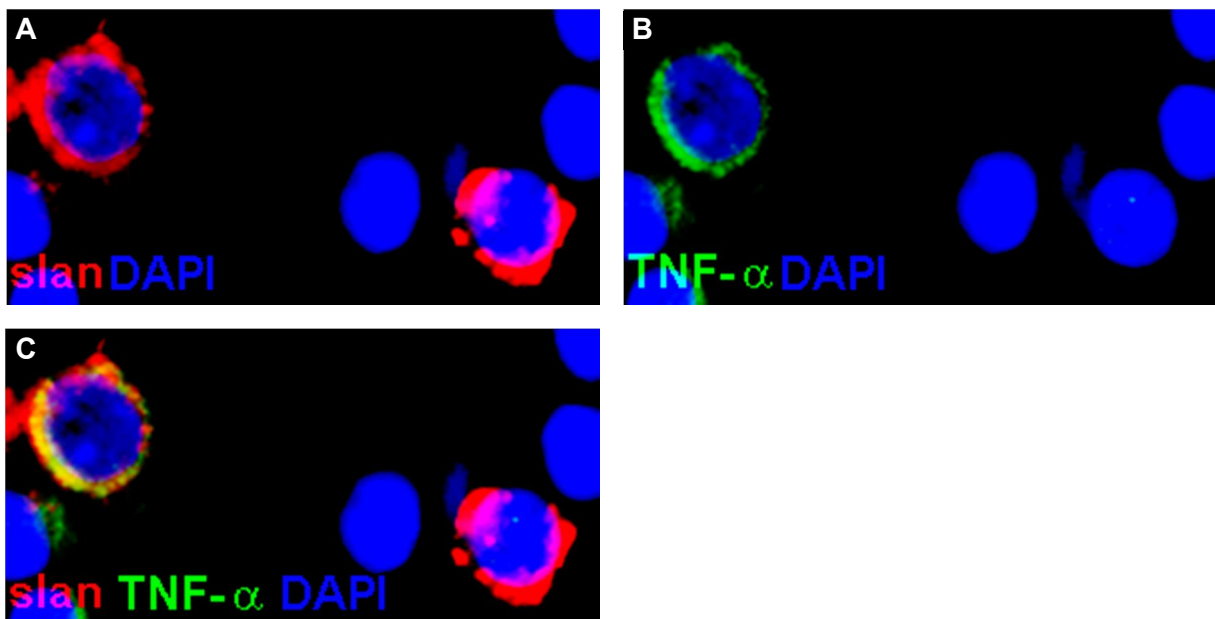


Abbildung 15: Nachweis einer TNF- α -exprimierenden slanDC in Kolonkarzinom-Gewebe. Es erfolgte eine Fluoreszenz-Doppelfärbung zur Darstellung von TNF- α ⁺ slanDCs mit Anti-slan Antikörpern und Anti-TNF- α Antikörpern. Fluorochromgekoppelte Detektionsreagenzien ermöglichten die Auswertung.

Die Aufnahmen erfolgten bei 400-facher originaler Vergrößerung. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Beispiel mit Darstellung einer einfach positiven slanDC und einer TNF- α -exprimierenden slanDC (**A** – slanDCs (rot), **B** – TNF- α ⁺ Zelle (grün), **C** – Overlay von A und B mit einer doppelt positiven Zelle in gelb (TNF- α -exprimierende slanDC)). Die Färbung der Zellkerne (blau) erfolgte mit DAPI.

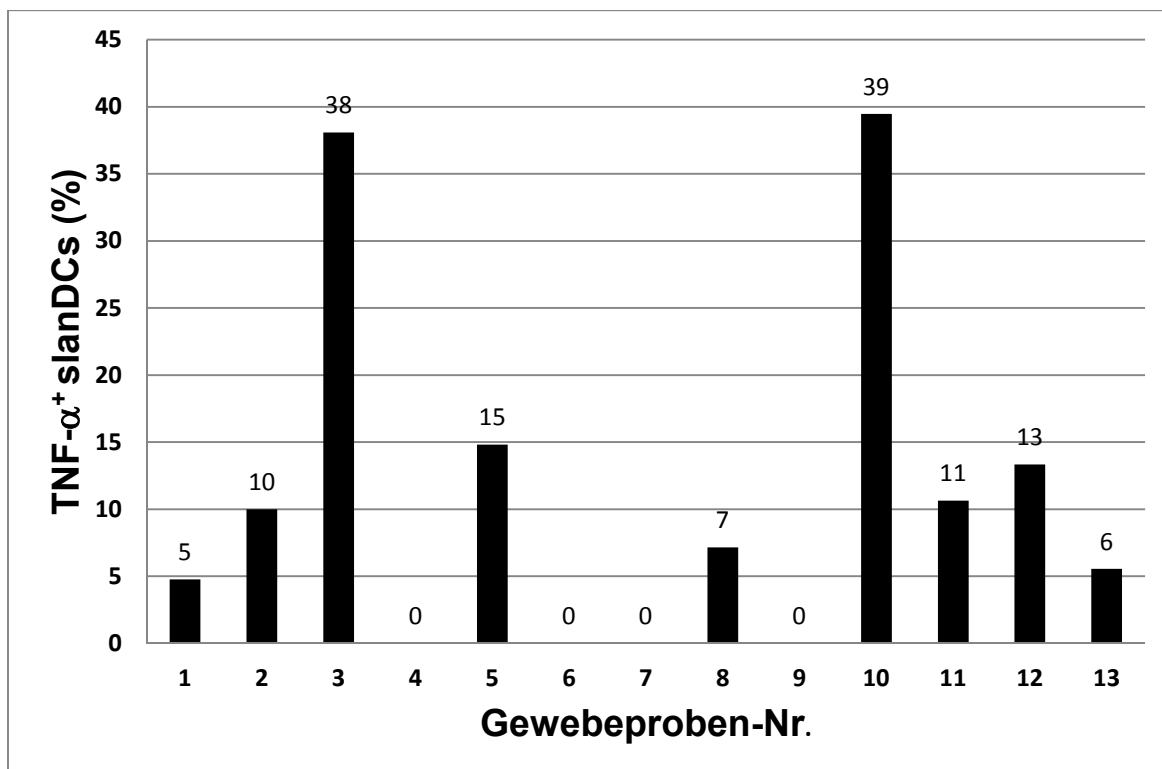


Abbildung 16: Prozentualer Anteil von TNF- α -exprimierenden slanDCs in Kolonkarzinom-Geweben. Der Nachweis der TNF- α ⁺ slanDCs erfolgte durch eine Immunfluoreszenzfärbung in 13 Kolonkarzinom-Gewebeproben mithilfe von Anti-TNF- α Antikörpern, Anti-slan Antikörpern und fluorchromgekoppelten Detektionsreagenzien. Das Diagramm zeigt die Einzelergebnisse der TNF- α -Expression durch slanDCs in den untersuchten Geweben. Die Säulen bilden den prozentualen Anteil der TNF- α -exprimierenden slanDCs an allen ausgezählten slanDCs in der jeweiligen Gewebeprobe ab.

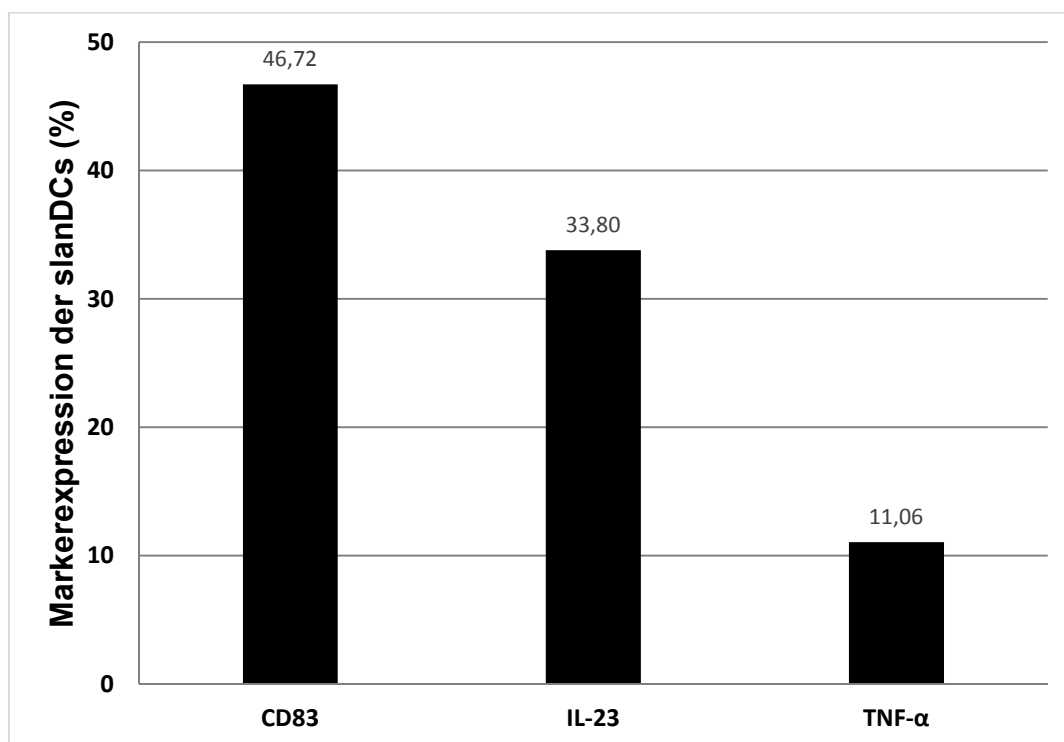


Abbildung 17: Vergleich der Markerexpression durch slanDCs in Kolonkarzinom-Gewebe. Das Diagramm zeigt die Expression von CD83, IL-23 und TNF- α durch slanDCs in Kolonkarzinom-Gewebeproben im Vergleich. Die Säulen stellen den Mittelwert der Einzelergebnisse der Gewebeproben dar.

3.7 Kolokalisation von slanDCs und CD3⁺ T-Lymphozyten in Kolonkarzinom-Gewebe

DCs sind im reifen Zustand in der Lage, naive T-Zellen in SLOs und Effektor-T-Lymphozyten zu aktivieren und die Differenzierung der verschiedenen T-Zell-Subpopulationen zu steuern. Für diese Aktivierungs- und Differenzierungsprozesse von T-Lymphozyten durch DCs müssen sie sich zueinander in räumlicher Nähe befinden und es sind mehrere Signale erforderlich (Reis e Sousa, 2006; Sabatté et al., 2007). T-Lymphozyten wird eine entscheidende Rolle in der Abwehr von Tumoren zugeschrieben: CTLs sind in der Lage, antigenspezifisch einen programmierten Zelltod in Tumorzellen zu induzieren und werden dabei von CD4⁺ T_H-Zellen unterstützt (Hung et al., 1998; Weigelin et al., 2011). T-Zell-Infiltrate mit den verschiedenen Subtypen von T-Lymphozyten stellen daher einen wichtigen Bestandteil der Tumor-Mikroumgebung dar und sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen der letzten Jahre. Besonders auch im KRK wurde die prognostische Bedeutung der verschiedenen T-Lymphozyten evaluiert (Galon et al., 2006; Tosolini et al., 2011).

SlanDCs können *in vitro* sowohl ruhende T-Zellen aktivieren als auch eine T-Zellantwort gegenüber einem Neoantigen generieren (Schäkel et al., 1998; Schäkel et al., 2002). Sommer et al. zeigten zudem bei der akuten GvHD eine *in vivo* Kolokalisation der dort detektierten slanDCs mit CD3⁺ T-Zellen (Sommer et al., 2014). Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob auch im Kolonkarzinom slanDCs in unmittelbarer Nähe zu T-Zellen detektiert werden können, wodurch man auf eine Interaktion zwischen den Zelltypen schließen könnte. Zu diesem Zweck wurden zehn Präparate mit einer immunhistochemischen Doppelfärbung des T-Lymphozyten-Markers CD3 und der slan-Struktur gefärbt und anschließend mithilfe von fluorochemgekoppelten Detektionsreagenzien unter dem Fluoreszenzmikroskop visualisiert. In allen Präparaten konnten slanDCs in räumlicher Beziehung zu T-Zellen nachgewiesen werden. Ein Beispiel davon zeigt Abbildung 18. Diese Ergebnisse weisen auf eine *in vivo* Interaktion zwischen slanDCs und T-Zellen in Kolonkarzinom-Gewebe hin.

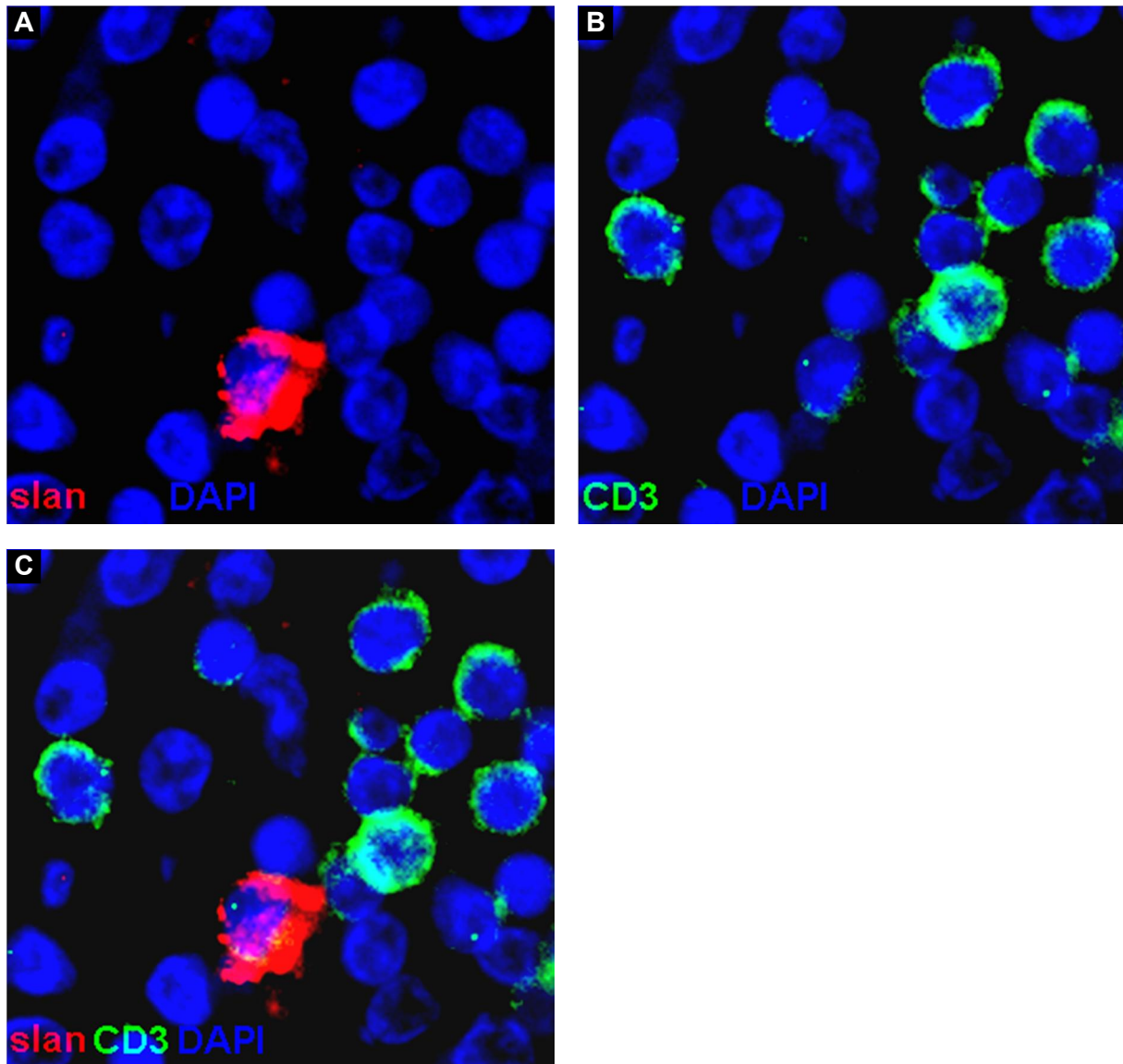


Abbildung 18: Nachweis einer Kolokalisation einer slanDC und mehrerer CD3⁺ T-Lymphozyten in Kolonkarzinom-Gewebe. Zum Nachweis einer Kolokalisation zwischen slanDCs und T-Lymphozyten im Kolonkarzinom wurde eine Fluoreszenzfärbung zur Darstellung von slanDCs und CD3⁺ T-Lymphozyten mithilfe von Anti-slan Antikörpern und Anti-CD3 Antikörpern durchgeführt. Fluorochromgekoppelte Sekundärantikörper bzw. fluorochromgekoppeltes Streptavidin erlaubten die Auswertung unter einem Fluoreszenzmikroskop. Die Aufnahmen erfolgten bei 400-facher originaler Vergrößerung. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Beispiel einer derartigen Kolokalisation mit mehreren CD3⁺ T-Lymphozyten und einer slanDC (**A** – slanDC (rot), **B** – CD3⁺ T-Lymphozyten, **C** – Overlay von A und B). Die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI angefärbt.

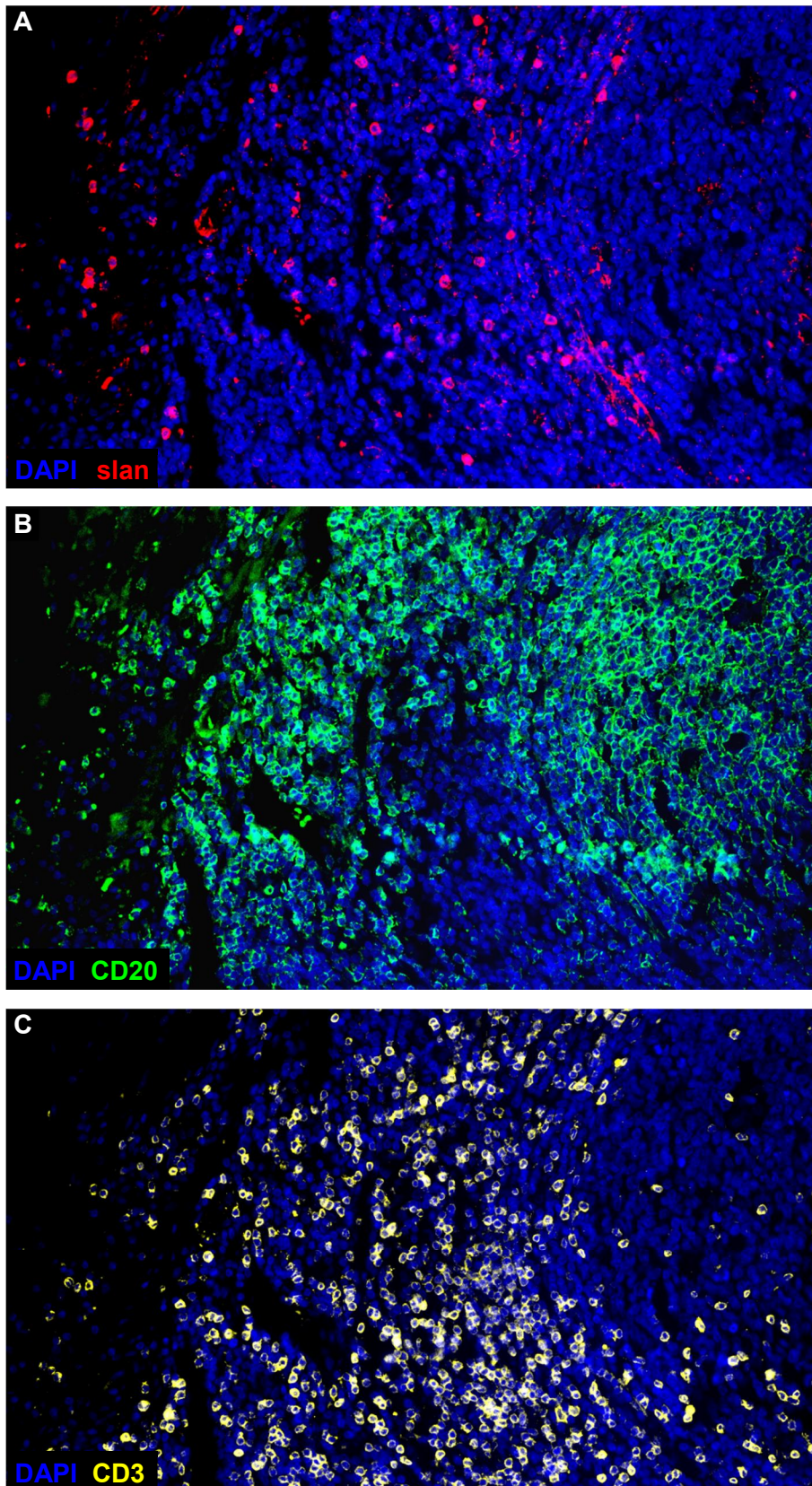
3.8 Detektion von slanDCs in tertiären lymphoiden Strukturen von Kolonkarzinom-Geweben

In Lokalisationen mit andauernder Präsenz von Antigenen und der Notwendigkeit einer Rekrutierung und Aktivierung von Lymphozyten können sich sogenannte TLS, auch als tertiäre lymphoide Organe oder ektopes lymphatisches Gewebe bezeichnet, nach dem Vorbild von SLOs durch lymphatische Neogenese herausbilden (Neyt et al., 2012). Zunächst wurden

diese Strukturen bei Autoimmunkrankheiten wie z. B. rheumatoider Arthritis (Takemura et al., 2001), mikrobiellen Infektionen (z. B. bei chronischer *Helicobacter pylori* Gastritis (Stolte und Eidt, 1989)) und chronischen Transplantatabstoßungen (Thaunat et al., 2005) nachgewiesen. Inzwischen konnte das Vorkommen derartiger Strukturen auch bei einigen primären Karzinomen gezeigt werden (Goc et al., 2013), Bergomas et al. wiesen solche Immunzellaggregate im KRK nach (Bergomas et al., 2011).

Nachdem bereits gezeigt wurde, dass die slanDCs im Kolonkarzinom mit T-Lymphozyten kolokalisieren, sollte nun untersucht werden, ob diese slanDCs auch in TLS in Kolonkarzinom-Geweben nachweisbar sind. Dafür wurde eine immunhistochemische Färbung an fünf vorselektierten Präparaten durchgeführt, wie unter 2.2.6 erläutert. Es wurden Präparate ausgewählt, die in der AP-Färbung oder der T-Zell-Kolokalisationsfärbung mehrfache ovale bis runde dichte Zellaggregate aufwiesen. Die Färbung erfolgte mit Antikörpern gerichtet gegen den B-Lymphozytenmarker CD20, den T-Zellmarker CD3 und die slan-Struktur. Fluorochromgekoppelte Sekundärantikörper bzw. fluorochromgekoppeltes Streptavidin erlaubten die Visualisierung unter dem Fluoreszenzmikroskop.

In allen gefärbten Präparaten wurden Lymphozytenaggregate mit unterschiedlich ausgeprägter B- und T-Zell-Zone gefunden. Interessanterweise konnten slanDCs in den T-Zell-Zonen derartiger Strukturen nachgewiesen werden (Abbildung 19). Diese Untersuchung zeigt erstmalig, dass slanDCs in TLS vorhanden sind und dort vornehmlich in der T-Zell-Zone lokalisiert sind.



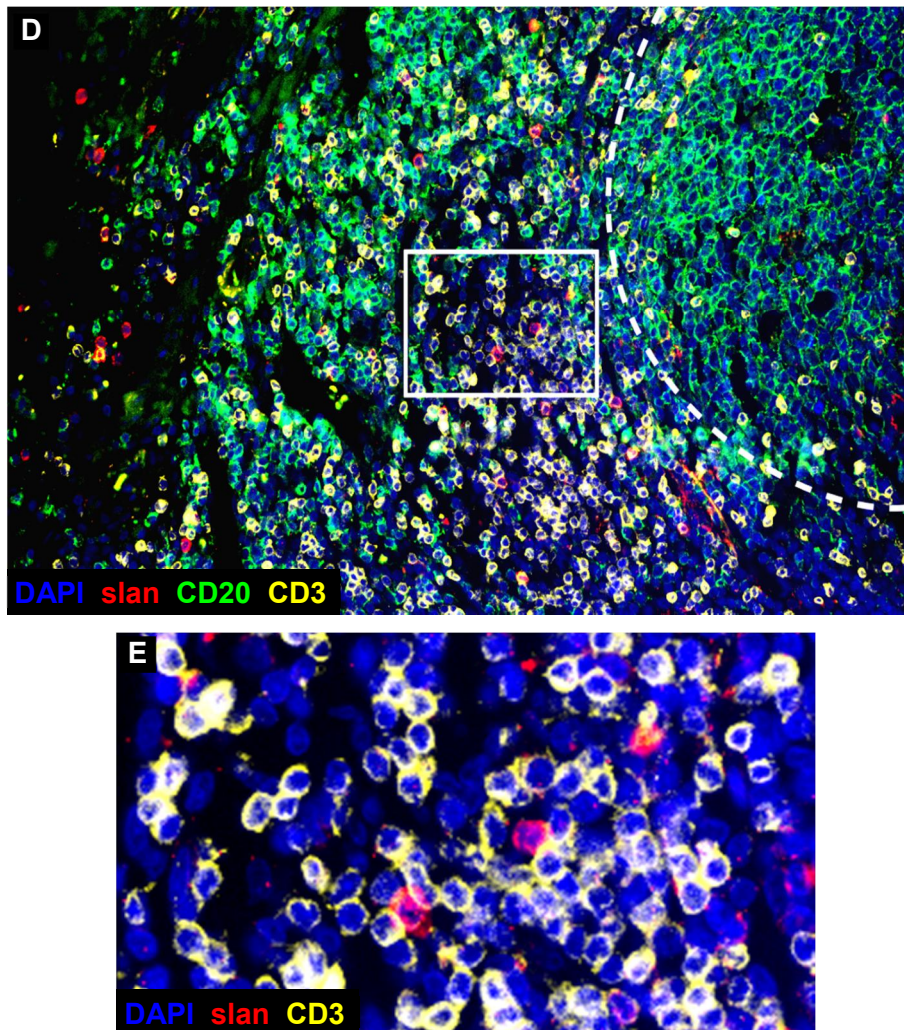


Abbildung 19: Darstellung einer tertiären lymphoiden Struktur mit slanDCs, CD3⁺ T-Lymphozyten und CD20⁺ B-Lymphozyten in einem Kolonkarzinom-Gewebe. Es erfolgte eine Fluoreszenzfärbung mit Antikörpern gerichtet gegen slan, CD3 und CD20 zur Darstellung von slanDCs und T- und B-Lymphozyten. Fluorochromgekoppelte Detektionsreagenzien ermöglichten die Auswertung unter einem Fluoreszenzmikroskop. Die Aufnahmen erfolgten bei 100-facher originaler Vergrößerung (A-D) bzw. 200-facher originaler Vergrößerung (E). Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Beispiel einer TLS in Kolonkarzinom-Gewebe (**A** – slanDCs (rot), **B** – CD20⁺ B-Lymphozyten (grün), **C** – CD3⁺ T-Lymphozyten (gelb), **D** – Overlay von A-C mit Verdeutlichung der Zonierung von B- und T-Lymphozyten, **E** – Detailansicht aus D mit zwei slanDCs in Kontakt mit T-Lymphozyten in der T-Zell-Zone der TLS). Die Anfärbung der Zellkerne (blau) erfolgte mit DAPI.

3.9 Expression von CD83 durch slanDCs in TLS von Kolonkarzinom-Geweben

Nachdem in den vorangegangenen Untersuchungen eine Präsenz von slanDCs in der T-Zell-Zone von TLS gezeigt werden konnte, sollten diese anschließend genauer charakterisiert werden. Zunächst stellte sich die Frage, ob ein Teil der dort lokalisierten slanDCs ebenfalls den Ausreifungsmarker CD83 exprimiert. Diese phänotypisch reifen slanDCs könnten, insbesondere aufgrund ihrer strategisch günstigen Lokalisation, an der Modulation einer Tumor-gerichteten T-Zell-Antwort in den TLS beteiligt sein.

In fünf Präparaten, welche in der vorangegangenen Färbung eine hohe Dichte an TLS aufwiesen, wurden die Oberflächenmarker CD20, CD3, slan und CD83 fluoreszenzmarkiert (siehe unter 2.2.7). Eine Anfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI. Anschließend wurden die Immunfluoreszenzfärbungen mithilfe eines Fluoreszenzmikroskop-Systems ausgewertet. Es wurde der prozentuale Anteil CD83-exprimierender slanDCs an den in der T-Zell-Zone möglicher TLS lokalisierten slanDCs ermittelt.

CD83-exprimierende slanDCs konnten in allen untersuchten Präparaten in der T-Zell-Zone möglicher TLS in unterschiedlichen Anteilen nachgewiesen werden. Abbildung 20 zeigt ein Beispiel von einer CD83⁺ und einer CD83⁻ slanDC in der T-Zell-Zone. Im Durchschnitt exprimierten 33,7 % der slanDCs den Reifemarker. Dabei wiesen zwei Präparate eine sehr hohe Expression von CD83⁺ slanDCs mit 71,4 % bzw. 65,0 % auf. In einer Gewebeprobe konnten jedoch nur 6,7 % slanDCs mit Markerexpression detektiert werden. Anhand dieser Färbungen konnte nachgewiesen werden, dass ein Teil der in TLS lokalisierten slanDCs den Reifemarker CD83 exprimieren, weshalb von einer phänotypischen Reife dieser Zellen ausgegangen werden kann.

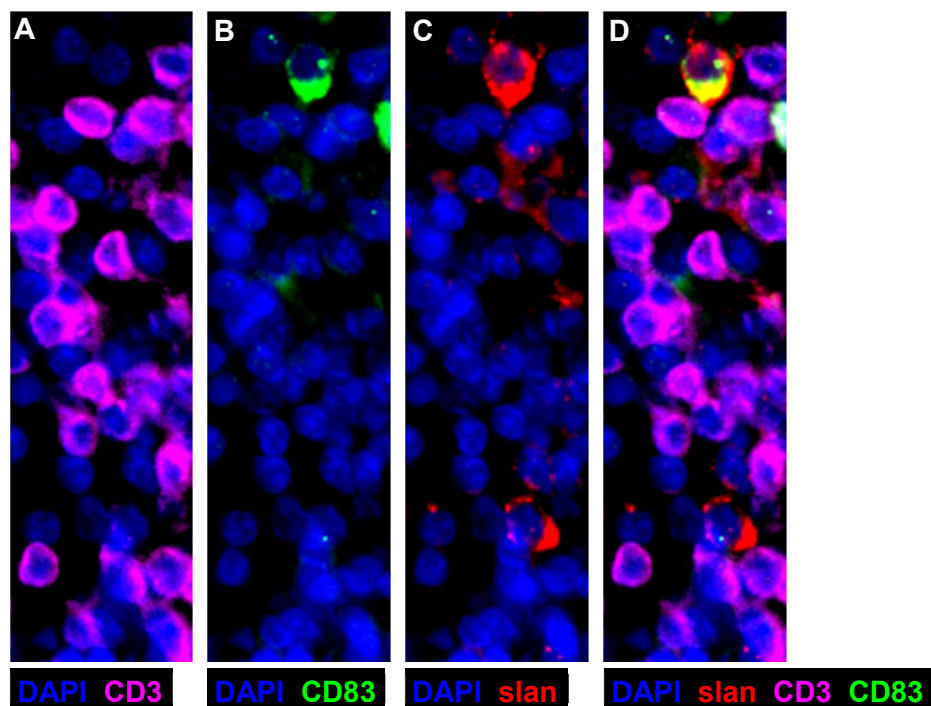


Abbildung 20: CD83-Expression einer slanDC in der T-Zell-Zone einer TLS. Es erfolgte eine Fluoreszenzfärbung zur Darstellung von CD83⁺ slanDCs und CD3⁺ T-Lymphozyten mithilfe von Anti-slan Antikörpern, Anti-CD83 Antikörpern und Anti-CD3 Antikörpern. Durch fluorochromgekoppelte Sekundärantikörper bzw. fluorochromgekoppeltes Streptavidin konnten die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Die Aufnahmen erfolgten bei 200-facher originaler Vergrößerung. Die Abbildung zeigt ein Beispiel eines Ausschnitts einer möglichen T-Zell-Zone einer TLS in einer Kolonkarzinom-Gewebeprobe mit T-Lymphozyten und zwei slanDCs, von denen eine CD83 exprimiert (**A** – CD3⁺ T-Lymphozyten (magenta), **B** – CD83⁺ Zellen (grün), **C** – slanDCs (rot), **D** – Overlay von A-C, die CD83-exprimierende slanDC erscheint gelb.) Eine Zellkernfärbung (blau) erfolgte mit DAPI.

3.10 Expression von IL-23 durch slanDCs in TLS von Kolonkarzinom-Geweben

Ausgehend von den Ergebnissen einer Expression von IL-23 durch slanDCs in Kolonkarzinom-Geweben, wurde anschließend untersucht, ob slanDCs in den T-Zell Zonen der TLS dieses Zytokin exprimieren und dadurch direkt T-Zellen beeinflussen können.

An Präparaten, welche bereits durch ihre hohe Dichte an TLS aufgefallen waren, wurden Immunfluoreszenzfärbungen von IL-23, CD4, CD20 und slan vorgenommen. Die Zellkerne wurden mit DAPI dargestellt. Die Auswertung erfolgte anschließend mithilfe des Fluoreszenzmikroskops. In fünf Präparaten wurde der prozentuale Anteil IL-23-exprimierender slanDCs an den in TLS lokalisierten slanDCs ermittelt.

In vier von fünf Präparaten (80 %) konnten IL-23-exprimierende slanDCs innerhalb von T-Zell-Zonen möglicher TLS detektiert werden (Abbildung 21). Der Mittelwert betrug 29,1 % mit einer Spannweite von 0 %–65,2 %. Diese Untersuchung gibt Hinweise, dass auch TLS-assoziierte slanDCs das Zytokin IL-23 exprimieren, und so möglicherweise eine wichtige Rolle in der IL-23/IL-17 Achse spielen könnten.

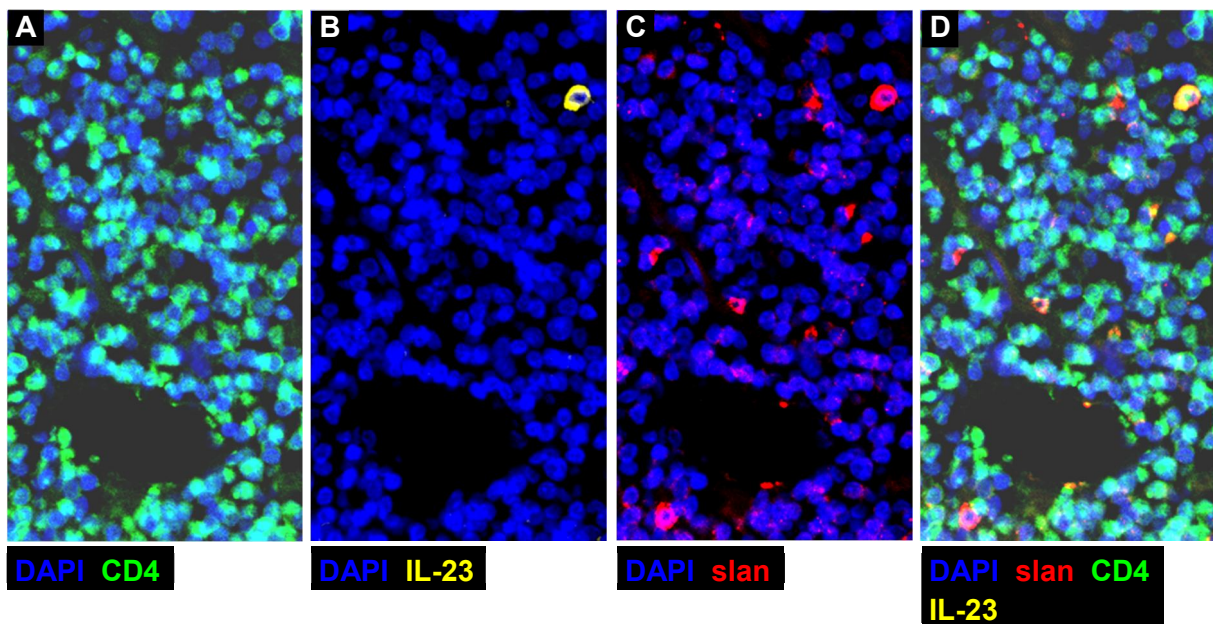


Abbildung 21: IL-23-Expression einer slanDC in der T-Zell-Zone einer TLS. Es erfolgte eine Fluoreszenzfärbung zur Darstellung von IL-23⁺ slanDCs und CD4⁺ T-Lymphozyten mithilfe von Anti-slan Antikörpern, Anti-IL-23 Antikörpern und Anti-CD4 Antikörpern. Fluorochromgekoppelte Sekundärantikörper bzw. fluorochromgekoppeltes Streptavidin erlaubten die Detektion der Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop. Die Aufnahmen erfolgten bei 200-facher originaler Vergrößerung. Die Abbildung zeigt ein Beispiel eines Ausschnitts einer T-Zell-Zone einer möglichen TLS im Kolonkarzinom mit zwei slanDCs, von denen eine IL-23 exprimiert, umgeben von T-Lymphozyten (**A** – CD4⁺ T-Lymphozyten (grün), **B** – IL-23⁺ Zellen (gelb), **C** – slanDCs (rot), **D** – Overlay von A-C, die IL-23-exprimierende slanDC erscheint orange). Die Zellkerne wurden mit DAPI blau gefärbt.

4 Diskussion

4.1 DCs als zentrale Mediatoren einer Tumor-gerichteten Immunantwort

DCs stellen als professionelle APCs eine entscheidende Verbindung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem dar und sind unerlässlich für die Induktion und Aufrechterhaltung einer Tumor-gerichteten Immunantwort (Steinman und Banchereau, 2007; Palucka und Banchereau, 2012; Strioga et al., 2013).

Im Rahmen von Tumorerkrankungen können unreife DCs aus den Blutgefäßen in das entartete Gewebe einwandern und dort Zellfragmente von apoptotischen oder nekrotischen Tumorzellen aufnehmen. Diese Peptide werden im Zellinneren prozessiert und auf MHC-Klasse-I- oder MHC-Klasse-II-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert (Dhodapkar et al., 2008; Strioga et al., 2013). Erfolgt zudem eine Aktivierung der DCs durch DAMPs, z. B. von sterbenden Tumorzellen freigesetzte Hitzeschockproteine, beginnen die DCs auszureifen. Auch proinflammatorische Zytokine von anderen infiltrierenden Immunzellen stimulieren die Ausreifung (Reis e Sousa, 2004; Nace et al., 2012; Garg et al., 2014). Während dieses Vorgangs wird die Expression kostimulatorischer Moleküle auf der Zelloberfläche angeregt und die DCs beginnen mit der Neusynthese und Sekretion verschiedener Zytokine. Es erfolgt eine Migration in die Tumor-drainierenden Lymphknoten. Dort kann nun eine Tumor-gerichtete T-Zell-Antwort durch die Interaktion der aktivierten DCs mit naiven antigenspezifischen CD4⁺ oder CD8⁺ T-Lymphozyten induziert werden (Banchereau et al., 2000; Sabatté et al., 2007; Strioga et al., 2013). CD8⁺ T-Lymphozyten differenzieren sich nach Aktivierung in CTLs und gelangen über die systemische Blutzirkulation in das Tumorgewebe, wo sie durch ihr zytotoxisches Potenzial Tumorzellen antigenspezifisch lysieren können (Weigelin et al., 2011). Verschiedene Subpopulationen von T_H-Zellen, welche sich aus naiven CD4⁺ T-Zellen entwickeln, wandern ebenfalls in den Tumor ein. Besonders T_H1-Zellen unterstützen u. a. die Stimulation von CD8⁺ T-Lymphozyten durch DCs und die Aktivierung von Makrophagen (Hung et al., 1998; Behrens et al., 2004).

Zusätzlich zur Aktivierung von T-Lymphozyten sind DCs auch in der Lage, die Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber Tumorzellen zu verstärken (Moretta, 2005; Wehner et al., 2011). Außerdem wurde für bestimmte Subpopulationen ein eigenständiges tumorizides Potential u. a. über die Sekretion des proinflammatorischen Zytokins TNF- α nachgewiesen (Schmitz et al., 2005; Tel et al., 2014). Aufgrund dieser zentralen Stellung in der immunologischen Abwehr von Tumoren kommt DCs derzeit eine große Bedeutung in der Forschung zu, besonders im Hinblick auf die Entwicklung neuer immuntherapeutischer Ansätze in der Tumorthherapie.

4.2 DCs als Komponente des Immunzellinfiltrats im Kolonkarzinom

Infiltrierende Immunzellen stellen einen wichtigen Bestandteil der Mikroumgebung zahlreicher Tumoren dar. Diese Immunzellinfiltrate weisen einen stark heterogenen Charakter auf und setzen sich aus verschiedenen Immunzelltypen zusammen wie B- und T-Lymphozyten, NK-Zellen, Makrophagen oder DCs (Fridman et al., 2012; Fridman et al., 2014; Giraldo et al., 2014). Die verschiedenen infiltrierenden Immunzell-Populationen sind abhängig von der Tumorentität mit einer verbesserten oder verschlechterten Prognose der Erkrankung assoziiert (Fridman et al., 2012).

Auch KRKs gehören zu den immunogenen Tumoren mit einer ausgeprägten Infiltration durch verschiedene Immunzellen. Besonders der Rolle von infiltrierenden T-Lymphozyten wird eine große Bedeutung in der derzeitigen Forschung zugeschrieben. So ist eine dichte Infiltration mit CD3⁺ T-Lymphozyten, CTLs und Gedächtnis-T-Lymphozyten mit einer guten Prognose unabhängig vom UICC-Stadium assoziiert (Pages et al., 2005; Galon et al., 2006; Pages et al., 2009; Fridman et al., 2012). Im Rahmen der geplanten Etablierung des Immunoscores sollen Aussagen zur Prognose und Therapieentscheidung auf Grundlage dieses individuellen Immunzellinfiltrats getroffen werden (Galon et al., 2012; Galon et al., 2014). Neben den verschiedenen Populationen von T-Lymphozyten, NK-Zellen und Makrophagen berichten einige Veröffentlichungen auch über DCs als Komponente des Immunzellinfiltrats des Kolonkarzinoms (Karthaus et al., 2012; Legitimo et al., 2014).

4.2.1 Immunhistochemischer Nachweis von DCs in Kolonkarzinom-Geweben

Zur Detektion von DCs in Kolonkarzinom-Geweben wurden bisher verschiedene Marker im Rahmen immunhistochemischer Färbungen verwendet. Dabei wurden zum Teil verschiedene Tumorkompartimente unterschieden: Die intraepitheliale DC-Infiltration wurde untersucht, d. h. DCs lokalisiert direkt im maligne-transformierten Epithel, außerdem die Infiltration des Stromas, welches die Tumorzellen umgibt. Einige Gruppen unterschieden zudem das Stroma des peripher gelegenen invasiven Randbereichs des Karzinoms. Grundsätzlich wurden die meisten DCs im Tumorzell-umgebenden Stroma und im peripher gelegenen Randbereich detektiert. Intraepithelial fand sich meist nur eine sehr geringe DC-Infiltrationsdichte.

Ambe et al. quantifizierten erstmalig DCs im Kolonkarzinom anhand des Markers S-100 und wiesen eine Akkumulation von S-100⁺ DCs im Vergleich zu gesunder Mukosa nach mit einer sowohl intraepithelialen, als auch stromalen Verteilung in vornehmlich peripheren Tumorebenen (Ambe et al., 1989). In nachfolgenden Studien wurden diese Ergebnisse bestätigt und S-100⁺ DCs zusätzlich in Lymphfollikeln der Submukosa detektiert (Nakayama et al., 2003). Später untersuchte eine weitere Forschungsgruppe die DC-Infiltration in 145

Kolonkarzinomen durch DCs mithilfe der Marker S-100, HLA-DR, des Ausreifungsmarkers CD83 und CD1a zur Identifikation unreifer DCs. Die höchste Frequenz wiesen S-100⁺ und HLA-DR⁺ DCs auf. CD83⁺ DCs wurden in sehr geringer Anzahl detektiert. Letztere wurden, wie auch alle anderen untersuchten DCs, vermehrt im invasiven Randbereich und weniger im Tumorzentrum nachgewiesen (Gulubova et al., 2012). Die Autoren interpretierten diese Verteilung als eine mögliche Migration reifer DCs aus dem Tumorgewebe in die peripheren Lymphknoten, um die aufgenommenen Antigene den dort lokalisierten T-Zellen zu präsentieren und eine Tumor-gerichtete Immunantwort zu induzieren (Gulubova et al., 2012).

Eine niederländische Arbeitsgruppe untersuchte Kolonkarzinom-Gewebe auf die Infiltration durch HLA-DR⁺ und S-100⁺ DCs und detektierte die höchste Anzahl dieser Zellen im Stroma. Im Gegensatz dazu wurde nur eine eher geringe intraepitheliale Infiltration mit vornehmlich S-100⁺ DCs nachgewiesen (Dadabayev et al., 2004). Eine höhere Anzahl dieser intraepithelialen DCs korrelierte mit einer vermehrten intraepithelialen Frequenz von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Später führten sie zudem immunhistochemische Färbungen von CD208, als Marker für reife DCs, und CD1a durch, wobei intraepithelial deutlich mehr unreife DCs als ausgereifte detektiert wurden (Dadabayev et al., 2004; Sandel et al., 2005). Im invasiven Randbereich konnte die höchste Anzahl CD208⁺ DCs detektiert werden. Des Weiteren konnten CD1a⁺ DCs vornehmlich im Randbereich und in höheren Frequenzen als CD208⁺ DCs nachgewiesen werden, im Gegensatz zu diesen jedoch auch in relevanter Anzahl intraepithelial (Suzuki et al., 2002; Sandel et al., 2005).

Schwaab et al. untersuchten reife DCs im Kolonkarzinom mittels immunhistochemischer Färbungen der Marker CD83, CD86, HLA-DR und CD40 und stellten eine verminderte Frequenz von CD83⁺ DCs im Vergleich zu direkt angrenzender tumorfreier Mukosa fest. Auch eine Präsenz dieser reifen DCs in der Randzone von lymphoiden Aggregaten wurde beschrieben. In Doppelfärbungen wurde zudem festgestellt, dass die verwendeten Reifemarker größtenteils gemeinsam auf DCs exprimiert werden (Schwaab et al., 2001). Auch Suzuki et al. untersuchten die Infiltration durch CD83⁺ DCs und beschrieben ihre Akkumulation vornehmlich in Clustern mit T-Lymphozyten (Suzuki et al., 2002). In einer weiteren Veröffentlichung wurden S-100⁺ und CD1a⁺ DCs im Epithel und Stroma von Kolonkarzinomen detektiert (Nagorsen et al., 2007). Eine verstärkte stromale Infiltration mit S-100⁺ DCs korrelierte mit einer verminderten systemischen T-Zell-Antwort und einer erhöhten Frequenz von T_{regs}. CD209, als ein weiterer Marker zur Identifikation unreifer DCs, wurde hingegen nur in geringem Maße auf DCs nachgewiesen (Nagorsen et al., 2007).

Eine andere Arbeitsgruppe untersuchte nicht nur die Infiltration von KRK-Geweben mit reifen (CD83⁺, CD208⁺) und unreifen (CD1a⁺) DCs, sondern auch kolorektale Adenome und

tumorfremie Mukosa (Yuan et al., 2008). In KRK-Geweben wurde eine ähnliche Verteilung von reifen DCs beobachtet wie bisher beschrieben: vornehmliche Lokalisation im Stroma des invasiven Randbereichs und in Immunzellinfiltraten. Zudem wurde die Untersuchung von Schwaab et al. bestätigt bzgl. einer verminderten Frequenz reifer DCs in KRK-Geweben im Vergleich zum Adenom und zur unveränderten Mukosa. Jedoch wurden im KRK sowohl intraepithelial als auch stromal vermehrt unreife DCs nachgewiesen (Yuan et al., 2008).

4.2.2 Zielstrukturen eingesetzter Antikörper in immunhistochemischen Färbungen von DCs

Die Marker, welche in den immunhistochemischen Färbungen der bisherigen Veröffentlichungen zum Nachweis nativer DCs in KRK-Geweben verwendet wurden, weisen zum Teil keine ausreichend hohe Spezifität zur Detektion von DCs auf (Karthaus et al., 2012). Einen häufig verwendeten Marker zur Untersuchung einer DC-Infiltration in Tumoren stellt das Protein S-100 dar, lange Zeit der einzige Marker für Tumor-infiltrierende DCs (Karthaus et al., 2012). Dieses Protein wurde ursprünglich in neuronalem Gewebe des Gehirns nachgewiesen, später wurde die Expression auf DCs gezeigt. Seitdem wird S-100 als ein allgemeiner Marker für DCs unabhängig von deren Reifezustand eingesetzt. Jedoch färben Anti-S-100 Antikörper auch neuronales Darmgewebe wie Ganglien und zudem Makrophagen (Perez et al., 2005; Gulubova et al., 2012; Karthaus et al., 2012). Bisherige Veröffentlichungen behalten sich jedoch vor, Ganglienzellen aufgrund ihrer zellulären Form und Makrophagen anhand ihrer Verteilung im Gewebe von DCs zu unterscheiden (Ambe et al., 1989; Dadabayev et al., 2004; Gulubova et al., 2012). In Doppelfärbungen mit CD163 stellten Nagorsen et al. fest, dass ca. 20 % der detektierten S-100⁺ Zellen doppelt positiv erschienen und daher zu den Makrophagen gerechnet werden mussten (Nagorsen et al., 2007).

HLA-Klasse-II-Moleküle wie HLA-DR sind auf der Oberfläche aller DCs vorhanden, jedoch wird die Expression bei Ausreifung stark hochreguliert, weshalb diese Moleküle vornehmlich als Marker für reife DCs eingesetzt werden (Dadabayev et al., 2004; Sabbaté et al., 2007; Collin et al., 2013). In geringerem Ausmaß wurden HLA-Klasse-II-Moleküle jedoch auch auf Makrophagen, B-Lymphozyten und aktivierten T-Lymphozyten detektiert (Dadabayev et al., 2004).

Zur Betrachtung des Reifezustands von DCs existieren verschiedene Marker zur Unterscheidung reif-unreif. CD1a, zunächst auf Langerhans-Zellen nachgewiesen, wird häufig zur Detektion unreifer DCs eingesetzt (Bell et al., 1999; Perez et al., 2005). Der Nachweis von DCs mithilfe dieses Markers ist jedoch auf wenige Subpopulationen von DCs im Gewebe und auf DCs, *in vitro* aus Monozyten generiert, begrenzt (Brigl und Brenner, 2004). Karthaus et al. beschreiben zudem, dass eine Expression von CD1a sowohl auf unreifen, als auch reifen DCs

gezeigt werden konnte (Karthaus et al., 2012). Zur immunhistochemischen Färbung reifer DCs stehen Antikörper gegen CD83 oder CD208 (DC-LAMP) zur Verfügung (Saint-Vis et al., 1998; Perez et al., 2005; Karthaus et al., 2012). CD209 (DC-SIGN) stellt einen DC-spezifischen Marker unreifer DCs dar, welcher jedoch nach Geijtenbeek et al. auch auf reifen DCs detektiert werden kann (Geijtenbeek et al., 2000; Karthaus et al., 2012).

Diese vielfältigen Widersprüche verdeutlichen die Notwendigkeit der Etablierung neuer Marker, um verwertbare Informationen über die Verteilung und die prognostische Bedeutung von DCs in Tumorgeweben zu erhalten (Karthaus et al., 2012). Die Verwendung der vorgestellten Marker erlaubt zwar die Beschreibung einer Präsenz und zum Teil auch Aussagen bezüglich des Reifezustands der DCs im Kolonkarzinom, ermöglicht aber keine Angaben über die Zugehörigkeit der detektierten DCs zu den bestimmten humanen Subpopulationen. Die Untersuchung Tumor-infiltrierender DCs ist jedoch nicht nur durch den Gebrauch dieser unterschiedlichen Marker, sondern auch aufgrund ihrer relativ niedrigen Frequenz und der starken interindividuellen Heterogenität erschwert (Tran Janco et al., 2015).

4.2.3 SlanDCs als DC-Subpopulation in Kolonkarzinom-Geweben

Bisher gibt es nur sehr wenige Veröffentlichungen in denen DCs einer bestimmten Subpopulation in KRK-Geweben beschrieben wurden. Gai et al. untersuchten KRK-Gewebe, tumorfreie Kolonschleimhaut und Tumor-drainierende bzw. tumorfreie Lymphknoten auf eine Infiltration durch mDCs und pDCs mithilfe der Marker CD11c und CD123. CD123⁺ pDCs konnten im Tumorgewebe häufiger detektiert werden als in tumorfreien Arealen und das pDC/mDC-Verhältnis in Tumor-drainierenden Lymphknoten war signifikant erhöht (Gai et al., 2013). Huang et al. beschrieben in Blutproben von Kolonkarzinom-Erkrankten eine 60-%ige Reduktion zirkulierender DCs im Vergleich zu gesunden Kontrollen mit einer Rückkehr zum Normalzustand nach kompletter Resektion des Karzinoms. Diese Reduktion ist assoziiert mit einer verstärkten Infiltration von CD1a⁺ und Langerin⁺ Langerhans-Zellen in der angrenzenden Mukosa des Primärtumors (Huang et al., 2003). Eine andere Studie bestätigte diese Reduktion von zirkulierenden DCs, insbesondere der pDC-Population, mit Fortschreiten der Erkrankung (Orsini et al., 2014). Eine weitere Arbeitsgruppe zeigte ebenfalls eine reduzierte Dichte zirkulierender DCs im Verlauf der Tumorerkrankung, welche zudem funktionelle Defekte, u. a. eine geringe Expression kostimulatorischer Moleküle, aufwiesen. Die reduzierte Zellzahl korrelierte dabei mit einem hohen Serumlevel des proangiogenetischen VEGFs (Della Porta et al., 2005).

SlanDCs stellen eine Subpopulation von Blut-DCs dar und werden zu den CD16⁺ mDCs gerechnet (Schäkel et al., 1998; Schäkel et al., 2002). SlanDCs unterscheiden sich von CD141⁺ und CD1c⁺ DCs durch die Ausprägung von slan anstatt des „cutaneous lymphocyte

antigen“ als Kohlenhydratmodifikation auf PSGL1. Zudem weisen sie charakteristischerweise eine Expression des Fc γ -Rezeptors III (CD16) und der Anaphylatoxinrezeptoren C3aR und C5aR auf (Schäkel et al., 2002). Eine Akkumulation von slanDCs wurde bereits in Gewebeproben verschiedener inflammatorischer Erkrankungen wie Psoriasis oder Lupus erythematodes und in Tumor-drainierenden Lymphknotenmetastasen detektiert (Hänsel et al., 2011; Hänsel et al., 2013; Sommer et al., 2014; Vermi et al., 2014). Auch in entzündlichen Erkrankungen des ZNS scheinen slanDCs eine Rolle zu spielen. Eine Präsenz von slanDCs konnte dort u. a. im Hirngewebe und im Liquor von Multiple Sklerose-Erkrankten und im Rahmen von Enzephalitiden und Meningitiden gezeigt werden (Thomas et al., 2014; Thomas et al., 2016). SlanDCs akkumulieren des Weiteren in der Mukosa entzündeter Darmabschnitte infolge eines Morbus Crohn (Bsat et al., 2015). Zudem konnten slanDCs kürzlich in Primärtumor-Geweben, Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen von klarzelligen Nierenzellkarzinomen nachgewiesen werden (Toma et al., 2015).

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Infiltration von 47 Kolonkarzinom-Geweben durch slanDCs anhand immunhistochemischer Färbungen mit Anti-human slan Antikörpern untersucht. Diese sind gegen die slan-Modifikation der Zellen gerichtet und erlauben so eine spezifische Detektion von slanDCs. Interessanterweise konnten in ca. 98 % der gefärbten Gewebe diese DCs in variablen Frequenzen mit einem Mittelwert von 16,07 slanDCs/mm² nachgewiesen werden. Wurden nur die 38 Tumorgewebe, welche in den direkten Vergleich mit den entsprechenden tumorfreien Kolon-Gewebeproben eingingen, betrachtet, ergab sich ein Mittelwert von 16,69 slanDCs/mm². Aufgrund häufiger unspezifischer Anfärbungen dieser Bereiche wurden die slanDCs nicht innerhalb des Epithels quantifiziert, sondern nur im Stroma. SlanDCs konnten sowohl verteilt im Tumorzell-umgebenden Stroma, im Stroma des invasiven Randbereichs, als auch innerhalb dichter Zellaggregate detektiert werden. Diese ersten immunhistochemischen Färbungen zeigen, dass slanDCs eine Komponente des Immunzellinfiltrats von Kolonkarzinomen darstellen. Im Vergleich dazu wurden in den 38 untersuchten korrespondierenden tumorfreien Geweben derselben Erkrankten mit 9,25 slanDCs/mm² signifikant niedrigere Frequenzen infiltrierender slanDCs nachgewiesen.

Des Weiteren wurden pDCs in Kolonkarzinomen quantifiziert. Da CD123 nicht nur auf pDCs, sondern auch auf anderen Zellen im Gewebe wie Makrophagen, Granulozyten und Endothelzellen exprimiert wird, wurde dafür im Gegensatz zu Gai et al. ein Anti-CD303 (BDCA-2) Antikörper verwendet. CD303 weist eine höhere Spezifität für pDCs auf, wird jedoch während des Reifevorgangs herunterreguliert, weshalb der Marker primär die Identifikation unreifer pDCs erlaubt (Karthaus et al., 2012). PDCs konnten in 70 % der 20 untersuchten Gewebe nachgewiesen werden, jedoch mit einem Mittelwert von 4,86 pDCs/mm² in signifikant niedrigerer Frequenz als slanDCs in diesen Geweben (18,85 slanDCs/mm²). Damit wird die

Aussage von Gai et al. bzgl. des Auftretens von pDCs im Kolonkarzinom bestätigt. Die höhere Frequenz weist auf eine mögliche Bedeutung der slanDCs in der Tumor-gerichteten Immunantwort im Kolonkarzinom hin. Beide DC-Subpopulationen zeigen große Unterschiede in der Infiltrationsdichte beim Vergleich der einzelnen analysierten Gewebe. In einigen Tumoren konnten die Zellen nicht oder in nur sehr geringer Zahl nachgewiesen werden, andere wiesen überdurchschnittlich hohe Frequenzen von slanDCs bzw. pDCs auf. Diese Beobachtungen lassen sich mit dem stark heterogenen Charakter von Immunzellinfiltraten erklären. Diese unterscheiden sich in Aufbau, Zusammensetzung und Dichte nicht nur bzgl. verschiedener Tumorentitäten, sondern zeigen auch interindividuell starke Schwankungen (Fridman et al., 2012). Auf diesen Erkenntnissen basieren zahlreiche Untersuchungen einer Assoziation zwischen Verteilung und Frequenz verschiedener Immunzellen und klinischen Parametern wie Tumorstadium oder Überleben.

Eine Infiltration mit slanDCs ist im Nierenzellkarzinom mit verkürztem tumorspezifischen, progressionsfreiem und Gesamtüberleben assoziiert, welches wahrscheinlich auf einen dort vorliegenden tolerogenen Phänotyp der slanDCs zurückzuführen ist (Toma et al., 2015).

Für diese Dissertation wurde daher eine Assoziation bzgl. der Frequenz infiltrierender slanDCs und den klinisch-pathologischen Charakteristika wie Tumorgröße und Lymphknotenmetastasen der Erkrankten untersucht. Im Stadium T3 fällt eine reduzierte Dichte von slanDCs im Vergleich zu T1, T2 oder T4 klassifizierten Tumoren auf. Die Frequenz infiltrierender slanDCs zwischen Tumoren mit bzw. ohne bereits vorliegenden Lymphknotenmetastasen zum Zeitpunkt der Kolektomie wies jedoch keinen signifikanten Unterschied auf.

Abhängig vom lokalen Milieu könnten DCs im Kolonkarzinom verschiedene antitumorale, jedoch auch Tumorwachstum-fördernde Funktionen im Rahmen von „Tumor-Escape“-Mechanismen ausüben. DCs sind in der Lage in Tumorgewebe zu migrieren und sind bereits in einer Auswahl von unterschiedlichen Tumoren mit einer Regression des neoplastischen Gewebes und dem Fehlen von Lymphknotenmetastasen assoziiert worden. Im KRK wurden die verschiedenen DC-Marker und ihre Lokalisationen je nach Veröffentlichung bisher sowohl mit guter als auch mit schlechter Prognose assoziiert. So wiesen Ambe et al. eine positive Korrelation zwischen einer hohen Dichte an S-100⁺ DCs in KRK-Geweben und einem verlängerten 5-Jahres-Überleben nach (Ambe et al., 1989). Eine andere Arbeitsgruppe assoziierte eine niedrige Frequenz von S-100⁺ Zellen mit fortgeschrittenem Erkrankungsstadium und dem Auftreten von Lymphknoten- oder Lebermetastasen (Nakayama et al., 2003). Auch Nagorsen et al. bestätigten ein verlängertes Überleben bei nachgewiesener starker DC-Infiltration. In einer weiteren Studie wurde eine geringere Dichte an reifen DCs mit fortgeschrittenem Tumorstadium, dem Vorliegen von Fernmetastasen und

starkem invasiven Wachstum assoziiert. CD83⁺ DCs, S-100⁺ und HLA⁺ Zellen korrelierten mit verlängertem Gesamtüberleben (Gulubova et al., 2012). Im Gegensatz dazu assoziierten Sandel et al. intraepithelial lokalisierte reife LAMP⁺ DCs und CD1a⁺ DCs im invasiven Randbereich mit verschlechtertem Überleben (Sandel et al., 2005). So könnten sich nicht nur die Frequenz, sondern auch phänotypische Veränderungen oder eine veränderte Zusammensetzung an DC-Subtypen auf die Prognose auswirken. Detaillierte Kenntnisse über Präsenz, Lokalisation und Funktion verschiedener Subtypen von DCs könnten daher weitere Fortschritte im Bereich der Immuntherapie ermöglichen. Ansätze hierfür stellen u. a. die Reaktivierung von infiltrierenden tolerogenen DCs oder die Hemmung immunsuppressiver Regulatorproteine in DCs dar (Karthaus et al., 2012).

4.3 Phänotyp infiltrierender slanDCs im Kolonkarzinom

Ausgehend vom Nachweis von Kolonkarzinom-infiltrierenden slanDCs wurde in weiteren Untersuchungen eine genauere Charakterisierung des Phänotyps dieser Zellen vorgenommen.

4.3.1 Expression von CD83 durch slanDCs

CD83 ist ein Glykoprotein aus der Immunglobulin-Superfamilie und wird während der Ausreifung von DCs verstärkt exprimiert. Das Protein gilt als einer der besten Marker zur Detektion reifer DCs. Seine selektive Hochregulierung gemeinsam mit den kostimulatorischen Molekülen CD80, CD86 und CD40 legt auch für CD83 eine wichtige Rolle in der Immunantwort nahe. Bisher konnten CD83 jedoch keine eindeutigen Funktionen zugeschrieben werden (Zhou und Tedder, 1995; Lechmann et al., 2002).

Schwaab et al. detektierten reife CD83⁺ DCs in KRK-Gewebe und stellten eine verringerte Infiltrationsdichte im Vergleich zu gesundem Darmgewebe fest (Schwaab et al., 2001). Auch in anderen Untersuchungen waren CD83-exprimierende DCs im KRK im Vergleich zum Adenom und nicht transformiertem Gewebe in ihrer Frequenz reduziert, wohingegen unreife CD1a⁺ DCs in einer deutlich höheren Dichte auftraten (Yuan et al., 2008). In einer weiteren Studie, welche im KRK CD1a, S-100, HLA-DR und CD83 als DC-Marker untersuchte, stellten CD83⁺ DCs den geringsten Anteil der anhand dieser Oberflächenmoleküle untersuchten DCs dar, waren jedoch mit einer guten Prognose assoziiert (Gulubova et al., 2012). Kürzlich analysierten Pryczynicz et al. CD83⁺ DCs im KRK und ihre Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern und bestätigten eine Reduktion dieser Zellen im Tumorgewebe im Vergleich zu unveränderter Darmschleimhaut (Pryczynicz et al., 2016). Dabei war eine erhöhte Frequenz infiltrierender CD83⁺ DCs assoziiert mit Metastasen in den Tumor-drainierenden

Lymphknoten und vermehrtes Auftreten von CD83⁺ DCs im Tumorzentrum mit einer Invasion von Tumorzellen in Blut- und Lymphgefäßen.

CD83⁺ DCs konnten in diesen Untersuchungen, wenn überhaupt, nur in sehr geringer Zahl intraepithelial nachgewiesen werden, vornehmlich akkumulierten die Zellen im Stroma peripherer Areale des Tumors oder im invasiven Randbereich (Yuan et al., 2008; Gulubova et al., 2012; Pryczynicz et al., 2016). Schwaab et al. beobachteten eine Akkumulation um Gefäße (Schwaab et al., 2001). Suzuki et al. detektierten CD83⁺ DCs vornehmlich in T-Lymphozyten-Clustern (Suzuki et al., 2002). Diese Beobachtungen wurden in einigen Veröffentlichungen als eine Migration reifer DCs aus dem Tumorzentrum heraus in Richtung Lymphknoten zur Induktion einer T-Zell-Antwort interpretiert (Schwaab et al., 2001; Yuan et al., 2008; Gulubova et al., 2012). Das vermehrte Auftreten von unreifen DCs in zentraleren Tumorregionen und auch intraepithelial könnte einen Hinweis darstellen, dass diese DCs noch mit der Aufnahme von Antigenen beschäftigt sind und erst infolgedessen mit dem Reifeprozess beginnen (Suzuki et al., 2002; Yuan et al., 2008). Es könnte jedoch auch auf eine Hemmung der Ausreifung der DCs durch Faktoren der Tumor-Mikroumgebung hindeuten (Gabrilovich, 2004; Yuan et al., 2008; Dudek et al., 2013). Sandel et al. assoziierten eine intraepitheliale Infiltration mit reifen DCs und eine Infiltration mit unreifen DCs im invasiven Randbereich mit schlechter Prognose. Eine Erklärung könnte die Hinderung unreifer DCs am Eindringen in das Tumorzentrum zur Proteinaufnahme und Prozession darstellen und die Hemmung einer Migration reifer DCs in die Peripherie zu den Lymphknoten (Sandel et al., 2005).

Aufgrund der zentralen Rolle von DCs in der Entstehung einer Tumor-gerichteten Immunantwort können Tumoren verschiedene Strategien entwickeln, die Ausreifung und Funktion von DCs im Rahmen von „Tumor-Escape“-Mechanismen zu stören und zum weiteren Fortschreiten der Erkrankung auszunutzen (Gabrilovich, 2004; Strioga et al., 2013; Legitimo et al., 2014). Reduzierte Zahlen, insbesondere von reifen DCs, lassen sich in einigen Tumorentitäten sowohl im Blutkreislauf als auch im Tumor und in Tumor-drainierenden Lymphknoten nachweisen (Schwaab et al., 2001; Huang et al., 2003; Della Porta et al., 2005; Yuan et al., 2008; Orsini et al., 2014; Pryczynicz et al., 2016). Zahlreiche lösliche Faktoren wie z. B. IL-6, IL-10, M-CSF, VEGF, TGF- β , IDO, PGE₂ oder Ganglioside, sezerniert von Tumorzellen und Zellen der Mikroumgebung, beeinflussen die Differenzierung von DCs aus Vorläuferzellen des Knochenmarks und verursachen dadurch systemische DC-Defekte und/oder inhibieren die Ausreifung immaturer DCs (Gabrilovich, 2004; Strioga et al., 2013; Legitimo et al., 2014). Tumor-infiltrierende DCs zeigen häufig verminderte Kapazitäten zur Antigenaufnahme und -präsentation, verminderte Expression kostimulatorischer Moleküle, verringerte Motilität und Migration und eine veränderte Zytokinproduktion. Eine Akkumulation unreifer DCs mit geringer MHC-Expression und ohne kostimulatorische Moleküle verhindert

die Aktivierung Tumor-gerichteter T-Lymphozyten und kann eine Toleranz gegenüber den Tumorzellen durch T-Zell-Anergie oder Abbau der Zellen durch Apoptose induzieren. Einen potentiellen Mechanismus dafür stellt die Interaktion von PD-L1 auf DCs mit PD1 auf T-Zellen dar (Dhodapkar et al., 2008; Seliger und Quandt, 2012; Strioga et al., 2013; Tran Janco et al., 2015).

Zudem kann im Tumormilieu die Entwicklung regulatorischer DCs mit immunsuppressiven Eigenschaften induziert werden. In diesem funktionellen Zustand sind die DCs u. a. durch die Produktion von TGF- β in der Lage, T_{regs} zu induzieren (Gabrilovich, 2004; Ma et al., 2013; Strioga et al., 2013; Legitimo et al., 2014). Störungen in der Entwicklung von DCs aus Vorläuferzellen können zur Akkumulation immunsuppressiver, unreifer myeloider Zellen wie den MDSCs führen (Gabrilovich, 2004; Legitimo et al., 2014). Auch nicht-immunogener Zelltod von Tumorzellen, z. B. im Rahmen einer Chemotherapie, kann einen vorwiegend unreifen Phänotyp von DCs im Tumorgewebe begünstigen (Dhodapkar et al., 2008). DCs können jedoch nicht nur die zwei Funktionszustände reif und unreif annehmen, sondern auch eine Reihe von Zwischenzuständen und der jeweilige Reifezustand gibt nicht gezwungenermaßen Auskunft über die tatsächliche Funktion. So können z. B. auch phänotypisch reife DCs in einer bestimmten Tumor-Mikroumgebung oder unter Einfluss von Chemotherapeutika tolerogene Eigenschaften annehmen (Dudek et al., 2013). Die Tumor-Mikroumgebung ist außerdem in der Lage, die Apoptose von DCs, z. B. durch bestimmte Mazine oder über HMGB1, zu induzieren (Ma et al., 2013). Michielsen et al. zeigten, dass Tumor-konditioniertes Medium von kultivierten KRKs die Ausreifung von DCs *in vitro* inhibiert und die Zytokinsekretion von IL-12 zu vermehrter Produktion des immunsuppressiven Zytokins IL-10 verschiebt (Michielsen et al., 2012). In einer weiteren Studie wurde eine verminderte *in vitro*-Differenzierung von Monozyten aus Blutproben KRK-Erkrankter in unreife DCs beobachtet. Außerdem wiesen die DCs eine verminderte Fähigkeit zur Antigenpräsentation und eine geringere T-Zell-Stimulationskapazität auf. Auch eine veränderte Expression von kostimulatorischen Molekülen, u. a. eine reduzierte Expression von CD83, wurde nachgewiesen. Ebenso wurde eine vermehrte Sekretion von IL-10 statt der proinflammatorischen Zytokine IL-12 oder TNF- α gezeigt (Orsini et al., 2013).

Im Rahmen dieser Dissertation wurde mithilfe von Fluoreszenzfärbungen des Oberflächenmarkers CD83 der Reifezustand von slanDCs in Kolonkarzinom-Geweben untersucht. Im Durchschnitt exprimierten 46,7 % der slanDCs CD83 auf ihrer Oberfläche. In acht der zehn untersuchten Gewebe zeigten mehr als 30 % der analysierten slanDCs eine Expression von CD83. Geht man bei diesen Zellen von einer phänotypischen und funktionellen Reife aus, könnten sie zu einer effektiven Tumor-gerichteten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Antwort beitragen. Unreife CD83⁻ DCs, wie sie in einem der untersuchten Gewebe zu mehr als 90 % vorlagen, könnten eine T-Zell-Anergie oder Toleranz gegenüber Tumorantigenen vermitteln.

4.3.2 Expression von Interleukin-23 durch slanDCs

IL-23 ist ein heterodimeres Zytokin, bestehend aus einer p40- und einer p19-Untereinheit. Es wird für die Expansion einer bestimmten Population von IL-17-produzierenden CD4⁺ T-Zellen benötigt. Diese als T_H17-Zellen bezeichneten T-Zellen produzieren nach Antigenkontakt die Zytokine IL-17, IL-17F, IL-6 und TNF- α (Aggarwal et al., 2003; Langrish et al., 2005; Iwakura und Ishigame, 2006). Die Hauptproduzenten von IL-23 sind aktivierte DCs und Makrophagen (Le et al., 2014). Es bindet an den IL-23-Rezeptor, woraufhin in den entsprechenden Zellen die Phosphorylierung und damit Aktivierung der Transkriptionsfaktoren „Signals Transducers and Activators of Transcription“ (STAT)1, 3, 4 und 5 ausgelöst werden kann (Paradowska-Gorycka et al., 2010). IL-23 gilt als wichtiges Zytokin in der Pathogenese von inflammatorischen Erkrankungen u. a. von entzündlichen Darmerkrankungen (Hue et al., 2006; Iwakura und Ishigame, 2006).

Langowski et al. zeigten eine signifikant verstärkte Expression von IL-23p19 in zahlreichen humanen Karzinomen, u. a. den kolorektalen Tumoren, im Vergleich zu unveränderten Geweben (Langowski et al., 2006). Auch in immunhistochemischen Färbungen von Kolonkarzinomen konnte eine stärkere zytoplasmatische bzw. membranöse Expression von IL-23 und IL-23R im Vergleich zu Adenomen und normaler Darmschleimhaut detektiert werden (Helbling et al., 2014). Zudem wurden bei KRK-Erkrankten im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöhte Serumlevel des Zytokins nachgewiesen, wobei hohe Konzentrationen mit einer verstärkten Expression von VEGF assoziiert waren (Ljubic et al., 2010). Diese verstärkte Expression könnte auf STAT3-abhängigen Signalwegen in der Tumorumgebung basieren, welche die Transkription IL-23 spezifischer Gene fördern (Kortylewski et al., 2009).

In KRK-Mausmodellen ergaben sich Hinweise auf eine IL-23-Produktion durch CD11b⁺ Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs) infolge einer Stimulation von TLR 2, 4 oder 9, nicht jedoch durch Makrophagen in unveränderter Lamina propria (Kortylewski et al., 2009; Grivennikov et al., 2012). Grivennikov et al. zeigten, dass durch eine gestörte epitheliale Barrierefunktion im Kolonkarzinom mikrobielle Produkte wie LPS in den Tumor eindringen und die dort ansässigen TAMs über TLRs zur Produktion von IL-23 anregen könnten, welche dann IL-17-produzierende Zellen induzieren (Grivennikov et al., 2012). Auch in humanen KRKs können Barrierestörungen im Bereich der Tumoren in Form einer Defizienz von Schlussleisten und einer gestörten Schleimproduktion aufgrund fehlender Becherzellen nachgewiesen werden (Grivennikov et al., 2012). IL-23 und IL-23-Rezeptor „knock out“ Mäuse wiesen eine reduzierte Tumorzellproliferation auf und eine inhibierte Adenom-Karzinom-Progression. Außerdem zeigten sie eine Reduktion weiterer Faktoren wie Matrix-Metalloproteinasen, jedoch wurde eine verstärkte Infiltration mit CD8⁺ T-Zellen beobachtet (Langowski et al., 2006). Grivennikov et al. konnten jedoch keine Rezeptoren für IL-23 auf Tumorepithelzellen nachweisen und

gehen daher nicht von einer direkten Wirkung des Zytokins auf die Tumorentwicklung aus. Jedoch kontrolliert IL-23 im Rahmen einer inflammatorischen Zytokinkaskade die Expression von IL-17 in der Tumor-Mikroumgebung, welches über seine entsprechenden Rezeptoren verschiedene tumorfördernde Wirkungen entfaltet (Grivennikov et al., 2012, Wang und Karin, 2015a, 2015b).

Korrespondierend zur vermehrten Expression von IL-23 wurde im KRK ebenso eine erhöhte Expression von IL-17 im Vergleich zu nicht-entartetem Gewebe nachgewiesen (Langowski et al., 2006; Liu et al., 2011; Grivennikov et al., 2012). IL-17 wird von T_H17-Zellen, $\gamma\delta$ -T-Zellen und „innate lymphoid cells“, lymphatischen Immunzellen, die weder B- noch T-Zell-Rezeptoren aufweisen, produziert (Grivennikov et al., 2012). T_H17-Zellen sind im KRK mit einer deutlichen Verkürzung des krankheitsfreien Überlebens assoziiert (Tosolini et al., 2011). Auch Liu et al. assoziierten das Zytokin IL-17 im KRK mit einer schlechten Prognose (Liu et al., 2011). Über seinen Rezeptor wirkt IL-17 u. a. auf verschiedene Zellen des hämatopoetischen Systems, Fibroblasten, aber auch auf Tumorzellen (Wang et al., 2014). Die biologische Funktion von IL-17 besteht u. a. in der Induktion einer verstärkten Zytokin- und Chemokinsekretion, der Freisetzung von Metalloproteinasen durch Makrophagen und Stromazellen und der vermehrten Expression von interzellulären Adhäsionsmolekülen auf Fibroblasten. Damit induziert es eine starke Entzündungsreaktion und spielt eine wichtige Rolle in der Abwehr extrazellulärer Pathogene, jedoch auch in der Entwicklung von Autoimmunkrankheiten (Numasaki et al., 2003; Iwakura und Ishigame, 2006). Im Mausmodell aktiviert IL-17 u. a. NF- κ B und ERK-Signalwege in transformierten Enterozyten und fördert die Proliferation dieser Zellen. Dadurch wird IL-17 eine wichtige Rolle in der frühen KRK-Entwicklung zugeschrieben. Zudem steigert IL-17 die Produktion von IL-6 in der Tumor-Mikroumgebung, welches über STAT3-abhängige Signalwege ebenfalls zur Tumorgenese beiträgt (Wang et al., 2014). Tumorstadium ist abhängig von einer effektiven Angiogenese, d. h. dem Sprossen neuer Kapillaren aus bereits existierenden Gefäßen. Neben dem bereits beschriebenen Effekt fördert IL-17 das Tumorstadium durch eine Verstärkung der Vaskularisierung des Tumorgewebes. Dabei stimuliert das Zytokin die Formation neuer Gefäße aus Endothelzellen. Zudem fördert es die Freisetzung proangiogenetischer Faktoren wie VEGF aus Tumorzellen und Fibroblasten (Numasaki et al., 2003; Liu et al., 2011).

In anderen Studien wird IL-23 auch eine direkte Wirkung auf Kolonkarzinomzellen über einen IL-23R auf deren Oberfläche zugeschrieben. Dadurch könnte IL-23 einen direkten Einfluss auf die Proliferation von Kolonkarzinomzellen ausüben, wie er bereits bei einer Zelllinie eines oralen Plattenepithelkarzinoms beschrieben wurde (Fukuda et al., 2010; Lan et al., 2011). Untersuchungen durch Suzuki et al. schlagen einen Zusammenhang zwischen fortgeschrittenem Krankheitsstadium und IL-23R-Expression auf KRK-Zellen vor und

bestätigen eine Verstärkung der Malignität der Tumorzellen einiger Zelllinien als direkten Effekt von IL-23 (Suzuki et al., 2012). Eine andere Studie bestätigte das Potential von IL-23, eine Metastasierung in einigen KRK-Zelllinien zu fördern (Le et al., 2014). Eine weitere Forschungsgruppe wies den IL-23R zusätzlich auf T_{regs} nach, wodurch IL-23 in der Lage wäre, die Reifung und Funktion dieser Zellen zu unterstützen (Kortylewski et al., 2009; Salama et al., 2009; Frey et al., 2010).

slanDCs sind in der Lage, nach Stimulation mit LPS IL-23 zu produzieren und dadurch die Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Lymphozyten zu IL-17-produzierenden T-Zellen zu fördern (Hänsel et al., 2011). Bisher konnten IL-23-exprimierende slanDCs bereits in immunhistochemischen Färbungen verschiedener entzündlich veränderter Gewebe wie Hautarealen mit Psoriasis oder Darmabschnitten im Rahmen einer akuten GvHD nachgewiesen werden (Hänsel et al., 2011; Sommer et al., 2014).

Im Rahmen dieser Dissertation wurden IL-23⁺ slanDCs in zehn von elf analysierten Kolonkarzinom-Geweben in unterschiedlichen Frequenzen nachgewiesen. In acht von elf Geweben exprimierten mehr als 30 % der infiltrierenden slanDCs dieses Zytokin. Im Vergleich zu den tumorfreien Resektionsrändern wiesen fünf von sieben Karzinom-Gewebe eine deutlich höhere Frequenz an IL-23⁺ slanDCs auf. Zudem stellte sich in Doppelfärbungen ein großer Anteil aller IL-23⁺ Zellen als slanDCs heraus. Dies identifiziert die DC-Subpopulation als einen weiteren wichtigen Produzenten des Zytokins in einigen Kolonkarzinom-Geweben und schreibt ihr eine mögliche Funktion in der Programmierung von IL17-produzierenden Zellen im Rahmen der IL-23/IL-17-Kaskade zu. Damit wäre eine entscheidende Rolle von slanDCs in der kolorektalen Tumorentstehung und- progression möglich.

4.3.3 Expression von Tumornekrosefaktor- α durch slanDCs

TNF- α wurde ursprünglich als ein Faktor entdeckt, der in der Lage ist, hämorrhagische Nekrosen von Meth-A induzierten Sarkomen in Mäusen herbeizuführen, gesundes Gewebe aber verschont (Carswell et al., 1975). Diese Beobachtung weckte große Hoffnung, einen attraktiven Kandidaten in der Bekämpfung von Tumoren entdeckt zu haben, jedoch werden gerade chronisch niedrigen Dosen von TNF- α inzwischen zahlreiche Tumorstadium-fördernde Effekte zugeschrieben. Des Weiteren wurde die Fähigkeit, *in vivo* zwischen gesundem und entartetem Gewebe bzgl. Zelltod zu unterscheiden, relativiert (Waters et al., 2013a). Synthese und Sekretion des Glykoproteins erfolgen vornehmlich durch DCs, Makrophagen, Lymphozyten und Mastzellen und seine vielfältigen Funktionen werden über die Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 vermittelt (Pfeffer, 2003; Hehlhans und Pfeffer, 2005). TNF- α ist einer der wichtigsten Entzündungsmediatoren und an der Abwehr von Bakterien,

Viren und Parasiten beteiligt. Er rekrutiert Leukozyten aus dem Blut an den Ort der Infektion und erhöht die Gefäßpermeabilität. Außerdem induziert TNF- α die Aktivierung von Makrophagen und DCs. Fieber, die Freisetzung von Akut-Phase-Proteinen und die Tumor-assoziierte Kachexie stellen systemische Effekte des Zytokins dar (Waters et al., 2013b).

Zu den Funktionen des Zytokins im Kontext von Tumoren zählen die Vermittlung von Zellüberleben und Proliferation, die Förderung der Angiogenese und Metastasierung, die Förderung der Expression von Entzündungsmediatoren, aber auch das Auslösen von Zelltod in Form von Apoptose oder Nekroptose. Tumorzellen weisen TNF-Rezeptoren auf und können selbst TNF- α sezernieren, welches dann als autokrines Überlebenssignal fungiert (Szlosarek et al., 2006; Balkwill, 2009; Waters et al., 2013a).

Chronisch-entzündliche Prozesse gelten als ein Risikofaktor für die Entstehung von Tumoren. So sind z. B. chronisch-entzündliche Darmerkrankungen mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von KRKs assoziiert (Mantovani et al., 2008; Terzic et al., 2010). TNF- α trägt zu Tumor-assoziierten Entzündungen bei durch Rekrutierung von Leukozyten und der Freisetzung weiterer Zytokine über die Aktivierung von Endothelzellen, sowie durch die Erhöhung der Gefäßpermeabilität. Zusätzlich ist das Zytokin in der Lage, die Funktion verschiedener infiltrierender Zelltypen zu modulieren, z. B. eine VEGF-Produktion in TAMs zu induzieren (Waters et al., 2013a). Jedoch zeichnen sich auch sporadische Kolonkarzinome durch ein Immunzellinfiltrat aus. Hier geht eine chronische Entzündung der Tumorentwicklung nicht voraus, sondern erfolgt als sekundäres Ereignis auf die Aktivierung verschiedener Onkogene oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (Balkwill und Mantovani, 2001; Mantovani et al., 2008; Terzic et al., 2010). Dort herrscht eine mehr oder weniger ausgeglichene Balance zwischen Tumor-fördernder Entzündungsreaktion, vornehmlich getragen durch Zellen des angeborenen Immunsystems, und einer adaptiven Tumor-gerichteten Immunantwort. Durch proinflammatorische Zytokine, sezerniert von Zellen des angeborenen Immunsystems und von Epithelzellen, wird die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies angeregt. Diese können Akkumulationen weiterer DNA-Mutationen begünstigen. Des Weiteren aktivieren proinflammatorische Zytokine Transkriptionsfaktoren in Tumorzellen und können so die Zellproliferation und damit das Tumorwachstum fördern oder Apoptosemechanismen inhibieren (Terzic et al., 2010). T-Lymphozyten als wichtige Effektorpopulation des adaptiven Immunsystems hingegen sind in der Lage, Tumorzellen abzutöten (Galon et al., 2006; Fridman et al., 2012). Sowohl Komponenten der chronischen Entzündung als auch Teile der adaptiven Immunantwort können jedoch situationsabhängig Tumor-fördernde oder auch Tumor-inhibierende Funktionen ausüben (Mantovani et al., 2008; Terzic et al., 2010).

Im Mausmodell von Kolitis-assoziiertem Darmkrebs konnte im Verlauf der Karzinomentwicklung eine erhöhte TNF-Expression detektiert werden und gleichzeitig eine vermehrte Leukozyteninfiltration der Lamina propria und Submukosa beobachtet werden. Eine TNF-Blockade durch Etanercept inhibierte die Tumorentstehung durch eine Hemmung der TNF-induzierten Infiltration mit Zellen des angeborenen Immunsystems (Popivanova et al., 2008). Obeed et al. wiesen eine erhöhte Expression von TNF- α -mRNA im KRK nach, wobei höhere Werte mit fortgeschrittenem Krankheitsstadium assoziiert waren (Al Obeed et al., 2014). Auch Grimm et al. bestätigten eine Expression von TNF- α im Kolonkarzinom, vornehmlich durch Tumorzellen. Eine starke Expression war assoziiert mit dem Vorliegen von Lymphknotenmetastasen und höherer Rezidivwahrscheinlichkeit (Grimm et al., 2011). Diese Ergebnisse deuten eher auf eine Tumor-fördernde Wirkung von TNF- α im Kolonkarzinom hin.

TNF- α spielt eine wichtige Rolle in der ADCC von Monozyten (Feinman et al., 1987). Auch slanDCs besitzen die Fähigkeit, eine ADCC gegenüber Tumorzellen auszuüben aufgrund der Expression von Fc γ II (CD16)- und Fc γ III (CD32)-Rezeptoren. TNF- α gilt hier als wichtiges Effektormolekül, da die Zugabe eines neutralisierenden Anti-TNF- α Antikörpers eine ADCC verhindert (Schmitz et al., 2002). LPS-stimulierte slanDCs sind in der Lage, große Mengen TNF- α *in vitro* zu produzieren (Schäkel et al., 2002), und eine TNF- α Expression durch diese Zellen wurde bereits bei Erkrankungen wie Psoriasis, SLE und GvHD nachgewiesen (Hänsel et al., 2011; Hänsel et al., 2013; Sommer et al., 2014). Zudem weisen IFN- γ -stimulierte slanDCs eine direkte tumorizide Kapazität auf, untransformierte Zellen sind jedoch nicht von dieser Zytotoxizität betroffen. Auch hier spielt TNF- α eine entscheidende Rolle bei der Lyse von Tumorzellen durch DCs (Schmitz et al., 2005).

Diese Arbeit identifiziert slanDCs als eine weitere Quelle für TNF- α in Kolonkarzinom-Geweben. Jedoch konnte nur eine sehr geringe Expression von TNF- α durch slanDCs nachgewiesen werden, was auf eine geringe Kapazität der infiltrierenden slanDCs im Kolonkarzinom zu TNF- α -abhängiger Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen hindeuten könnte.

4.4 SlanDCs als Komponente von tertiären lymphoiden Strukturen im Kolonkarzinom

In verschiedenen Tumor-Entitäten, besonders im KRK, konnte ein positiver prognostischer Effekt von Tumor-infiltrierenden T-Lymphozyten nachgewiesen werden (Pages et al., 2005; Galon et al., 2006; Pages et al., 2009). Allgemein gilt, dass eine adaptive Immunantwort in SLOs, insbesondere den drainierenden Lymphknoten von entzündetem, infiziertem oder maligne entartetem Gewebe, generiert wird. Dafür erfolgt die Aufnahme und Prozessierung von Proteinen im Tumorgewebe durch APCs und eine anschließende Migration durch Blut-

und Lymphgefäße in die lymphatischen Organe (Mellman et al., 2011; Abbas et al., 2012; Murphy et al., 2014). In den letzten Jahren häuften sich jedoch die Hinweise auf weitere Strukturen direkt am Ort des Geschehens, z. B. der chronischen Entzündung, als eine Lokalisation der Induktion einer adaptiven Immunantwort. Es besteht die Möglichkeit der Neubildung von ektopem lymphatischem Gewebe, den sogenannten TLS (Goc et al., 2013; Dieu-Nosjean et al., 2014).

Derartige Strukturen wurden bei persistierenden bakteriellen oder viralen Infektionen, z. B. im Magen während einer persistierenden *Helicobacter pylori* Gastritis oder in der Leber bei chronischer Hepatitis C Infektion, nachgewiesen. Dort könnten die TLS durch die Generierung einer adaptiven Immunantwort an der Beseitigung der Pathogene beteiligt sein. Ihre Präsenz im chronisch-entzündlichen Milieu wurde jedoch auch mit einer unangemessenen Aktivierung von B- und T-Zellen mit resultierenden autoimmunen Reaktionen oder der Entwicklung von Lymphomen assoziiert. TLS wurden im Rahmen von Autoimmunerkrankungen, z. B. in der Synovia bei rheumatoider Arthritis, in den Speicheldrüsen beim Sjögren Syndrom und in der Hirnhaut bei multipler Sklerose beschrieben (Neyt et al., 2012; Dieu-Nosjean et al., 2014).

Der genaue Entstehungsmechanismus der TLS, besonders in der Tumor-Mikroumgebung, ist noch unbekannt. Diese weist zwar etliche Gemeinsamkeiten mit einer chronischen Entzündung auf, zeichnet sich jedoch häufig durch immunsuppressive Elemente aus wie MDSCs, M2-Makrophagen und T_{regs} . Dennoch lassen sich TLS sowohl in humanen Primärtumoren wie im Melanom, nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (NSCLC) und KRK, als auch in Metastasen nachweisen. Die Detektion erfolgt dabei unabhängig vom jeweiligen Tumorstadium in sehr unterschiedlicher Dichte, nicht nur abhängig vom Tumortyp, sondern auch mit großen interindividuellen Unterschieden. Zudem unterscheiden sich die Strukturen in Größe und Abgrenzbarkeit der unterschiedlichen Zonen, wahrscheinlich abhängig von ihrem Reifezustand (Goc et al., 2013; Dieu-Nosjean et al., 2014).

TLS weisen strukturelle Ähnlichkeiten mit SLOs auf und bestehen aus einer aneinander grenzenden B- und T-Zellzone, umgeben von hochendothelialen Venolen (HEVs) (Dieu-Nosjean et al., 2008; Goc et al., 2014b). Zudem wurden $CD21^+$ folliculäre DCs in der B-Zell-Zone und reife $LAMP^+$ bzw. $CD83^+$ DCs in der T-Zell-Zone beschrieben. Letztere können beim NSCLC nur in TLS detektiert werden und korrelieren mit einem verlängerten krankheitsfreien, krankheitsspezifischen und Gesamtüberleben (Dieu-Nosjean et al., 2008). Ebenfalls im NSCLC wurden reife DCs in TLS mit einer T_H1 -Immunzellantwort und zytotoxischen Effektorfunktionen assoziiert. Dies deutet auf einen Einfluss der TLS auf die Tumor-Mikroumgebung hin und auf eine Schlüsselrolle in der Koordination einer adaptiven Immunantwort. TLS-infiltrierende DCs könnten Tumor-assoziierte Antigene präsentieren und

vor Ort eine Tumor-gerichtete Immunantwort induzieren (Goc et al., 2014b). Die Arbeitsgruppe bestätigt, dass eine hohe Dichte von LAMP⁺ DCs im NSCLC mit verbessertem Langzeitüberleben assoziiert ist. Die Infiltrationsrate der DCs übt dabei einen stärkeren Effekt auf das Überleben aus, als die Frequenz der infiltrierenden CD8⁺ T-Zellen. Dadurch können Erkrankte mit hoher CD8⁺ T-Zell-Infiltrationsrate, aber dennoch schlechter Prognose aufgrund niedriger Frequenz von LAMP⁺ DCs identifiziert werden (Goc et al., 2014b). McMullen et al. zeigten jedoch, dass die Frequenz von TLS-assoziierten CD83⁺ DCs im Rektumkarzinom signifikant niedrigere Werte aufweist als in tumorfreien Geweben und keine Aussagen zum Überleben zulässt (McMullen et al., 2010).

Naive B- und T-Lymphozyten konnten in den Tumoren nur innerhalb der TLS nachgewiesen werden. Verschiedene Ergebnisse deuten daraufhin, dass TLS Orte der Generierung einer lokalen Tumor-gerichteten Immunantwort darstellen: Durch verschiedene Chemokine könnten T- und B-Zellen mithilfe von HEVs in TLS rekrutiert werden. Diese Rekrutierung vom Blut in TLS könnte einen wichtigen Zugangsweg der Lymphozyten in den Tumor darstellen (Goc et al., 2013; Goc et al., 2014a; Goc et al., 2014b). B-Zellen proliferieren und differenzieren daraufhin in der B-Zell-Zone, CD8⁺ T-Zellen werden durch reife DCs aktiviert und differenzieren in Effektorpopulationen, welche zu Tumorzell-Nestern migrieren und antigenspezifisch Tumorzellen lysieren. CD4⁺ T-Zellen liefern dafür wichtige Hilfe-Signale. So erfolgt eine humorale und zelluläre Immunantwort. Durch TLS-assoziierte lymphatische Gefäße könnten derart aktivierte, tumorspezifische Zellen in die drainierenden Lymphknoten und zurück in die Blutzirkulation gelangen und dadurch einer Tumorzell-Dissemination und Metastasierung entgegen wirken. Eine rein passive Rolle der Strukturen und Abhängigkeit von SLOs kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Es existieren jedoch einige Hinweise auf ihre aktive Rolle in der Induktion der Tumor-gerichteten Immunantwort (Goc et al., 2013; Goc et al., 2014a): So können z. B. $LT\alpha^{-/-}$ Mäuse, welche keine peripheren Lymphknoten ausbilden, dennoch eine Tumor-gerichtete Immunantwort entwickeln (Schrama et al., 2007) und die Präsenz von TLS ist assoziiert mit dem Auftreten von Tumor-gerichteten T-Zellen (Schrama et al., 2001).

Bergomas et al. wiesen die Existenz von TLS im KRK nach (Bergomas et al., 2011). Dort sind die Strukturen angrenzend an die Tumornester oder im invasiven Randbereich lokalisiert. Der Aufbau entspricht den bisher in anderen Tumorentitäten gezeigten TLS mit einer B-Zell-Zone mit follikulären DCs und einer T-Zell-Zone mit LAMP⁺ reifen DCs (Bergomas et al., 2011). Eine weitere Veröffentlichung dieser Arbeitsgruppe zeigte zudem die Ausprägung von HEVs in diesen Strukturen und die Expression der Chemokine CCL21 und CXCL13. Eine hohe Dichte dieser Strukturen korrelierte mit einer dichten Infiltration von T-Lymphozyten des Tumors und ist bei fehlendem Lymphknotenbefall mit einer verbesserten Prognose assoziiert (Di Caro et

al., 2014). Remark et al. untersuchten die Immunumgebung in Lungenmetastasen vom KRK und Nierenzellkarzinom. In den Lungenmetastasen des KRKs konnten deutlich mehr TLS als in Lungenmetastasen des Nierenzellkarzinoms nachgewiesen werden. Eine dichte Infiltration mit LAMP⁺ DCs und CD8⁺ T-Lymphozyten dieser Metastasen konnte im KRK mit verbessertem Überleben assoziiert werden, korrelierte jedoch im Nierenzellkarzinom mit schlechterer Prognose (Remark et al., 2013).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Präsenz von slanDCs in Kolonkarzinom-assoziierten TLS untersucht. Interessanterweise konnten slanDCs in den TLS nachgewiesen werden, vornehmlich lokalisiert in der T-Zell-Zone der Strukturen. In weiteren Fluoreszenzfärbungen wurde eine genauere Charakterisierung der slanDCs in den TLS vorgenommen. In einigen der untersuchten Gewebeproben wies ein deutlicher Teil der slanDCs in den TLS einen reifen Phänotyp auf oder exprimierte das Zytokin IL-23. Diese Untersuchungen stellen einen Hinweis für eine Beteiligung von slanDCs an der Modulation einer Tumor-gerichteten adaptiven Immunantwort in der T-Zell-Zone von TLS dar und verdeutlichen eine potentielle Rolle der slanDCs in der immunologischen Abwehr und Wachstumskontrolle von Tumoren.

5 Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom (KRK) zählt zu den immunogenen Tumoren und zeichnet sich durch eine ausgeprägte Infiltration von verschiedenen Immunzell-Populationen aus. Dabei scheinen insbesondere $CD8^+$ T-Lymphozyten und $CD4^+$ T-Helfer-Zellen Typ 1 das Tumorstadium zu beeinflussen und spielen somit eine zunehmende Rolle als prognostische Marker. Dementsprechend ergaben sich mehrere Hinweise, dass eine hohe Frequenz dieser beiden T-Zell-Populationen in KRK-Geweben mit einer erhöhten Überlebensrate assoziiert ist. Diese neuen Erkenntnisse könnten zukünftig in die Klassifikation des KRKs einfließen und therapeutische Entscheidungen beeinflussen. Im Gegensatz zu Tumor-infiltrierenden T-Zellen ist jedoch über die Frequenz und die Eigenschaften von nativen humanen dendritischen Zellen (DCs) in Kolonkarzinom-Geweben und deren mögliche Rolle in der immunologischen Abwehr von Tumoren nur sehr wenig bekannt. Als professionelle antigenpräsentierende Zellen spielen DCs eine Schlüsselrolle bei der Induktion und Aufrechterhaltung einer Tumor-gerichteten Immunantwort und können dadurch die Tumorentwicklung wesentlich beeinflussen. Daher wurden im Rahmen dieser Dissertation erstmalig Frequenz, Verteilung, Reifestatus und Zytokinexpression von 6-sulfo LacNAc⁺ (slan) DCs in Kolonkarzinom-Geweben sowie in korrespondierenden tumorfreien Kolon-Geweben untersucht. slanDCs stellen eine große Subpopulation von humanen Blut-DCs dar, die nach Aktivierung hohe Konzentrationen von verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen sezernieren. Darüber hinaus sind sie effizient in der Lage, die antitumoralen Eigenschaften von $CD8^+$ T-Lymphozyten und $CD4^+$ T-Helfer-Zellen sowie von Natürlichen Killer-Zellen zu fördern. Ausgehend von diesen Eigenschaften könnten slanDCs einen Beitrag zur Immunabwehr des Kolonkarzinoms leisten und somit das Tumorstadium beeinflussen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen der Nachweis von slanDCs in Kolonkarzinom-Geweben erbracht. In diesem Zusammenhang konnte eine höhere Frequenz von slanDCs in Kolonkarzinom-Geweben (Mittelwert: 16,69 slanDCs/mm², n=38) im Vergleich zu den korrespondierenden tumorfreien Geweben (Mittelwert: 9,25 slanDCs/mm², n=38) detektiert werden. Des Weiteren wurde eine höhere Dichte von infiltrierenden slanDCs in Kolonkarzinom-Gewebeproben (Mittelwert: 18,85 slanDCs/mm², n=20) im Vergleich zu plasmazytoiden DCs (Mittelwert: 4,86 pDCs/mm², n=20), welche eine andere Subpopulation von humanen DCs im Blut repräsentieren, nachgewiesen. Ausgehend von diesen Erkenntnissen erfolgten verschiedene Immunfluoreszenzfärbungen zur Untersuchung des Reifestatus und der Zytokinexpression der Kolonkarzinom-infiltrierenden slanDCs. Dabei konnten in allen zehn untersuchten Tumorgeweben $CD83^+$ slanDCs detektiert werden (Mittelwert: 46,7 % $CD83^+$ slanDCs), was auf einen reifen Phänotyp dieser DCs hinweist. Zudem erfolgte der Nachweis einer Interleukin (IL)-23-

Expression in variabler Ausprägung durch infiltrierende slanDCs in zehn von elf analysierten Kolonkarzinom-Geweben (Mittelwert: 33,8 % IL-23⁺ slanDCs). Dabei stellte sich heraus, dass slanDCs einen wesentlichen Anteil der IL-23-exprimierenden Zellen in einigen untersuchten Gewebeproben darstellen. Eine Expression von Tumornekrosefaktor- α durch Kolonkarzinom-infiltrierende slanDCs wurde hingegen nur in einer geringen Frequenz detektiert. Weitere Untersuchungen identifizierten slanDCs als neue zelluläre Komponente der T-Zell-Zone von tertiären lymphoiden Strukturen (TLS) der Tumorumgebung des Kolonkarzinoms. Darüber hinaus wies ein deutlicher Anteil der dort lokalisierten slanDCs einen reifen Phänotyp oder eine Expression von IL-23 auf.

Ausgehend von diesen neuen Ergebnissen könnten die infiltrierenden slanDCs an der Modulation einer adaptiven Immunantwort in der T-Zell-Zone Kolonkarzinom-assoziiierter TLS beteiligt sein und einen Einfluss auf das Tumorstadium ausüben. Weiterhin könnte die Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-23 durch slanDCs im Tumor-umgebenden Stroma und in den TLS eine Induktion IL-17-produzierender Zellen fördern und damit auf eine Beteiligung der slanDCs an einem entzündungsbedingten Fortschreiten der Tumorerkrankung über die IL-23/IL-17-Achse hindeuten. Insgesamt leisten die gewonnenen Erkenntnisse einen Beitrag zum Verständnis der Rolle von humanen nativen DCs im Kolonkarzinom und könnten die Entwicklung neuer immuntherapeutischer Strategien in der Behandlung dieser Tumorerkrankung fördern.

6 Summary

Colorectal cancer as an immunogenic tumor is characterized by a marked infiltration of different immune cell populations. Especially CD8⁺ T-lymphocytes and CD4⁺ T helper cells type 1 seem to influence tumor growth and therefore play an increasing role as prognostic markers. Thus, it has been shown that high densities of these T cell subsets are associated with improved survival of colorectal cancer patients. These new insights could become part of the classification of colorectal cancer and influence therapeutic decisions. Despite these studies, little is known about the frequency and properties of native human dendritic cells (DCs) in colon cancer tissues and their potential role in antitumor immunity. DCs as professional antigen-presenting cells are critical for the induction and maintenance of antitumor immunity and can essentially influence tumor progression. Thus, the frequency, distribution, maturation, and cytokine expression of 6-sulfo LacNAc⁺ (slan) DCs in colon cancer tissues as well as in corresponding tumor-free colon specimens were investigated. SlanDCs represent a subset of human blood DCs that secrete large amounts of proinflammatory cytokines upon activation. Furthermore slanDCs are able to efficiently activate CD4⁺ T cells, tumor-reactive CD8⁺ T cells, and natural killer cells. Due to these functional properties, slanDCs may contribute to antitumor immunity and may influence tumor growth.

Within this doctoral thesis the presence of slanDCs in primary colon cancer samples was immunohistochemically verified. In this context, a higher frequency of slanDCs in colon cancer tissues (mean: 16,69 slanDCs/mm², n=38) in comparison to the corresponding tumor-free specimens (mean: 9,25 slanDCs/mm², n=38) could be detected. Moreover, higher frequencies of infiltrating slanDCs in colon cancer tissues (mean: 18,85 slanDCs/mm², n=20) were detectable compared to plasmacytoid DCs (mean: 4,86 pDCs/mm², n=20), representing another human blood DC-subset. Based on these results, various immunofluorescence stainings were performed to investigate maturation and cytokine expression of the infiltrating slanDCs. SlanDCs expressing the maturation marker CD83 were detected in all 10 analyzed colon cancer tissues (mean: 46,7% CD83⁺ slanDCs). In addition, IL-23-expressing slanDCs were present at varying percentages in 10 of 11 evaluated colon cancer samples (mean: 33,8% IL-23⁺ slanDCs). Interestingly, in several tissues slanDCs represented a marked proportion of all IL-23-expressing cells. However, slanDCs expressing tumor necrosis factor- α could only be detected in low frequencies in the analyzed colon cancer specimens. Further studies revealed that slanDCs are a novel component of the T-cell zone of colon cancer-associated tertiary lymphoid structures (TLS). A proportion of these TLS-associated slanDCs displays a mature phenotype or express IL-23.

These novel findings indicate that slanDCs may modulate adaptive immune responses in the T-cell zone of colon cancer-associated TLS and may contribute to the regulation of tumor progression. Furthermore the IL-23-expressing slanDCs in the tumor-surrounding stroma and the TLS may promote the generation of IL-17-producing cells and may participate in inflammation-related cancer progression mediated by the IL-23/IL-17 axis. These novel observations can help to decipher the role of human native DCs in colon cancer and may have implications for the design of therapeutic strategies against this tumor entity.

7 Literaturverzeichnis

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. 2012. Cellular and Molecular Immunology. 7. Aufl. Elsevier Saunders, Philadelphia, PA.
- Acuto O, Michel F. 2003. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol* 3:939–951.
- Aggarwal S, Ghilardi N, Xie M, de Sauvage FJ, Gurney AL. 2003. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* 278:1910–1914.
- Ahmed KA, Wang L, Xiang J. 2012. A new dynamic model of three cell interactions for CTL responses. *Oncoimmunology* 1:1430–1432.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. 2006. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* 124:783–801.
- Al Obeed OA, Alkhayal KA, Al Sheikh A, Zubaidi AM, Vaali-Mohammed M, Boushey R, Mckerrow JH, Abdulla M. 2014. Increased expression of tumor necrosis factor- α is associated with advanced colorectal cancer stages. *World J Gastroenterol* 20:18390–18396.
- Ambe K, Mori M, Enjoji M. 1989. S-100 protein-positive dendritic cells in colorectal adenocarcinomas. Distribution and relation to the clinical prognosis. *Cancer* 63:496–503.
- Arnold D, Seufferlein T. 2010. Targeted treatments in colorectal cancer: state of the art and future perspectives. *Gut* 59:838–858.
- Balkwill F. 2009. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer* 9:361–371.
- Balkwill F, Mantovani A. 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357:539–545.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18:767–811.
- Banchereau J, Palucka AK. 2005. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* 5:296–306.
- Banchereau J, Steinman RM. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245–252.
- Behrens G, Li M, Smith CM, Belz GT, Minter J, Carbone FR, Heath WR. 2004. Helper T cells, dendritic cells and CTL Immunity. *Immunol Cell Biol* 82:84–90.
- Bell D, Chomarat P, Broyles D, Netto G, Harb GM, Lebecque S, Valladeau J, Davoust J, Palucka KA, Banchereau J. 1999. In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. *J Exp Med* 190:1417–1426.
- Bergomas F, Grizzi F, Doni A, Pesce S, Laghi L, Allavena P, Mantovani A, Marchesi F. 2011. Tertiary intratumor lymphoid tissue in colo-rectal cancer. *Cancers (Basel)* 4:1–10.
- Berke G. 1994. The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular aspects. *Annu Rev Immunol* 12:735–773.
- Bettington M, Walker N, Clouston A, Brown I, Leggett B, Whitehall V. 2013. The serrated pathway to colorectal carcinoma: current concepts and challenges. *Histopathology* 62:367–386.
- Bosman FT. 2010. WHO classification of tumours of the digestive system. 4. Aufl. IARC, Lyon.

- Brenner H, Chang-Claude J, Seiler CM, Rickert A, Hoffmeister M. 2011. Protection from colorectal cancer after colonoscopy: a population-based, case-control study. *Ann Intern Med* 154:22–30.
- Brenner H, Kloor M, Pox CP. 2014. Colorectal cancer. *Lancet* 383:1490–1502.
- Brigl M, Brenner MB. 2004. CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu Rev Immunol* 22:817–890.
- Bsat M, Chapuy L, Baba N, Rubio M, Panzini B, Wassef R, Richard C, Soucy G, Mehta H, Sarfati M. 2015. Differential accumulation and function of proinflammatory 6-sulfo LacNAc dendritic cells in lymph node and colon of Crohn's versus ulcerative colitis patients. *J Leukoc Biol* 98:671–681.
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:3666–3670.
- Chen GY, Nunez G. 2010. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol* 10:826–837.
- Coca S, Perez-Piqueras J, Martinez D, Colmenarejo A, Saez MA, Vallejo C, Martos JA, Moreno M. 1997. The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 79:2320–2328.
- Collin M, McGovern N, Haniffa M. 2013. Human dendritic cell subsets. *Immunology* 140:22–30.
- Couzin-Frankel J. 2013. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science* 342:1432–1433.
- Dadabayev AR, Sandel MH, Menon AG, Morreau H, Melief CJM, Offringa R, van der Burg SH, Janssen-van Rhijn C, Ensink NG, Tollenaar RA, van de Velde CJ, Kuppen P. 2004. Dendritic cells in colorectal cancer correlate with other tumor-infiltrating immune cells. *Cancer Immunol Immunother* 53:978–986.
- Della Porta M, Danova M, Rigolin GM, Brugnattelli S, Rovati B, Tronconi C, Fraulini C, Russo Rossi A, Riccardi A, Castoldi G. 2005. Dendritic cells and vascular endothelial growth factor in colorectal cancer: correlations with clinicobiological findings. *Oncology* 68:276–284.
- Dhodapkar MV, Dhodapkar KM, Palucka AK. 2008. Interactions of tumor cells with dendritic cells: balancing immunity and tolerance. *Cell Death Differ* 15:39–50.
- Di Caro G, Bergomas F, Grizzi F, Doni A, Bianchi P, Malesci A, Laghi L, Allavena P, Mantovani A, Marchesi F. 2014. Occurrence of tertiary lymphoid tissue is associated with T-cell infiltration and predicts better prognosis in early-stage colorectal cancers. *Clin Cancer Res* 20:2147–2158.
- Dieu-Nosjean M, Antoine M, Danel C, Heudes D, Wislez M, Poulot V, Rabbe N, Laurans L, Tartour E, Chaisemartin L de, Lebecque S, Fridman WH, Cadranel J. 2008. Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *J Clin Oncol* 26:4410–4417.
- Dieu-Nosjean M, Goc J, Giraldo NA, Sautès-Fridman C, Fridman WH. 2014. Tertiary lymphoid structures in cancer and beyond. *Trends Immunol* 35:571–580.
- Dobel T, Kunze A, Babatz J, Trankner K, Ludwig A, Schmitz M, Enk A, Schäkel K. 2013. FcγRIII (CD16) equips immature 6-sulfo LacNAc-expressing dendritic cells (sIaDCs) with a unique capacity to handle IgG-complexed antigens. *Blood* 121:3609–3618.
- Dolcetti R, Viel A, Doglioni C, Russo A, Guidoboni M, Capozzi E, Vecchiato N, Macri E, Fornasari M, Boiocchi M. 1999. High prevalence of activated intraepithelial cytotoxic T

- lymphocytes and increased neoplastic cell apoptosis in colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Am J Pathol* 154:1805–1813.
- Dudek AM, Martin S, Garg AD, Agostinis P. 2013. Immature, Semi-Mature, and Fully Mature Dendritic Cells: Toward a DC-Cancer Cells Interface That Augments Anticancer Immunity. *Front Immunol* 4:438.
- Edin S, Wikberg ML, Oldenborg P, Palmqvist R. 2013. Macrophages: Good guys in colorectal cancer. *Oncoimmunology* 2:e23038.
- Engstrom PF, Arnoletti JP, Benson AB3, Chen Y, Choti MA, Cooper HS, Covey A, Dilawari RA, Early DS, Enzinger PC, Fakih MG, Fleshman J, JR, Fuchs C, Grem JL, Kiel K, Knol JA, Leong LA, Lin E, Mulcahy MF, Rao S, Ryan DP, Saltz L, Shibata D, Skibber JM, Sofocleous C, Thomas J, Venook AP, Willett C. 2009. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: colon cancer. *J Natl Compr Canc Netw* 7:778–831.
- Facciabene A, Motz GT, Coukos G. 2012. T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis. *Cancer Res* 72:2162–2171.
- Fearon ER. 2011. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol* 6:479–507.
- Feinman R, Henriksen-DeStefano D, Tsujimoto M, Vilcek J. 1987. Tumor necrosis factor is an important mediator of tumor cell killing by human monocytes. *J Immunol* 138:635–640.
- Ferlazzo G, Morandi B. 2014. Cross-Talks between Natural Killer Cells and Distinct Subsets of Dendritic Cells. *Front Immunol* 5:159.
- Finn OJ. 2008. Cancer immunology. *N Engl J Med* 358:2704–2715.
- Fooksman DR, Vardhana S, Vasiliver-Shamis G, Liese J, Blair DA, Waite J, Sacristán C, Victora GD, Zanin-Zhorov A, Dustin ML. 2010. Functional anatomy of T cell activation and synapse formation. *Annu Rev Immunol* 28:79–105.
- Forssell J, Oberg A, Henriksson ML, Stenling R, Jung A, Palmqvist R. 2007. High macrophage infiltration along the tumor front correlates with improved survival in colon cancer. *Clin Cancer Res* 13:1472–1479.
- Frey DM, Drosier RA, Viehl CT, Zlobec I, Lugli A, Zingg U, Oertli D, Kettelhack C, Terracciano L, Tornillo L. 2010. High frequency of tumor-infiltrating FOXP3(+) regulatory T cells predicts improved survival in mismatch repair-proficient colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 126:2635–2643.
- Fridman WH, Pages F, Sautès-Fridman C, Galon J. 2012. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat.Rev.Cancer*. 12:298–306.
- Fridman WH, Remark R, Goc J, Giraldo NA, Becht E, Hammond SA, Damotte D, Dieu-Nosjean M, Sautès-Fridman C. 2014. The immune microenvironment: a major player in human cancers. *Int Arch Allergy Immunol* 164:13–26.
- Fukuda M, Ehara M, Suzuki S, Ohmori Y, Sakashita H. 2010. IL-23 promotes growth and proliferation in human squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Int J Oncol* 36:1355–1365.
- Gabrilovich D. 2004. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat Rev Immunol* 4:941–952.
- Gai XD, Song Y, Li C, Lei YM, Yang B. 2013. Potential role of plasmacytoid dendritic cells for FOXP3+ regulatory T cell development in human colorectal cancer and tumor draining lymph node. *Pathol Res Pract* 209:774–778.
- Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoue F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Pages F. 2006. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313:1960–1964.

- Galon J, Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Berger A, Lagorce C, Lugli A, Zlobec I, Hartmann A, Bifulco C, Nagtegaal ID, Palmqvist R, Masucci GV, Botti G, Tatangelo F, Delrio P, Maio M, Laghi L, Grizzi F, Asslaber M, D'Arrigo C, Vidal-Vanaclocha F, Zavadova E, Chouchane L, Ohashi PS, Hafezi-Bakhtiari S, Wouters BG, Roehrl M, Nguyen L, Kawakami Y, Hazama S, Okuno K, Ogino S, Gibbs P, Waring P, Sato N, Torigoe T, Itoh K, Patel PS, Shukla SN, Wang Y, Kopetz S, Sinicrope FA, Scripcariu V, Ascierto PA, Marincola FM, Fox BA, Pages F. 2014. Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. *J Pathol* 232:199–209.
- Galon J, Pages F, Marincola FM, Angell HK, Thurin M, Lugli A, Zlobec I, Berger A, Bifulco C, Botti G, Tatangelo F, Britten CM, Kreiter S, Chouchane L, Delrio P, Arndt H, Asslaber M, Maio M, Masucci GV, Mihm M, Vidal-Vanaclocha F, Allison JP, Gnjjatic S, Hakansson L, Huber C, Singh-Jasuja H, Ottensmeier C, Zwierzina H, Laghi L, Grizzi F, Ohashi PS, Shaw PA, Clarke BA, Wouters BG, Kawakami Y, Hazama S, Okuno K, Wang E, O'Donnell-Tormey J, Lagorce C, Pawelec G, Nishimura MI, Hawkins R, Lapointe R, Lundqvist A, Khleif SN, Ogino S, Gibbs P, Waring P, Sato N, Torigoe T, Itoh K, Patel PS, Shukla SN, Palmqvist R, Nagtegaal ID, Wang Y, D'Arrigo C, Kopetz S, Sinicrope FA, Trinchieri G, Gajewski TF, Ascierto PA, Fox BA. 2012. Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *J Transl Med* 10:205.
- Gamrekelashvili J, Greten TF, Korangy F. 2015. Immunogenicity of necrotic cell death. *Cell Mol Life Sci* 72:273–283.
- Garg AD, Martin S, Golab J, Agostinis P. 2014. Danger signalling during cancer cell death: origins, plasticity and regulation. *Cell Death Differ* 21:26–38.
- Geginat J, Paroni M, Facciotti F, Gruarin P, Kastirr I, Caprioli F, Pagani M, Abrignani S. 2013. The CD4-centered universe of human T cell subsets. *Semin Immunol* 25:252–262.
- Geijtenbeek TBH, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GCF, Adema GJ, van Kooyk Y, Figdor CG. 2000. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100:575–585.
- Giraldo NA, Becht E, Remark R, Damotte D, Sautès-Fridman C, Fridman WH. 2014. The immune contexture of primary and metastatic human tumours. *Curr Opin Immunol* 27:8–15.
- Goc J, Fridman WH, Hammond SA, Sautès-Fridman C, Dieu-Nosjean MC. 2014a. Tertiary lymphoid structures in human lung cancers, a new driver of antitumor immune responses. *Oncoimmunology* 3:e28976.
- Goc J, Fridman WH, Sautès-Fridman C, Dieu-Nosjean MC. 2013. Characteristics of tertiary lymphoid structures in primary cancers. *Oncoimmunology* 2:e26836.
- Goc J, Germain C, Vo-Bourgais TKD, Lupo A, Klein C, Knockaert S, Chaisemartin L de, Ouakrim H, Becht E, Alifano M, Validire P, Remark R, Hammond SA, Cremer I, Damotte D, Fridman WH, Sautès-Fridman C, Dieu-Nosjean M. 2014b. Dendritic cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures signal a Th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating CD8+ T cells. *Cancer Res* 74:705–715.
- Grimm M, Lazariotou M, Kircher S, Höfelmayer A, Germer CT, von Rahden BHA, Waaga-Gasser AM, Gasser M. 2011. Tumor necrosis factor- α is associated with positive lymph node status in patients with recurrence of colorectal cancer-indications for anti-TNF- α agents in cancer treatment. *Cell Oncol (Dordr)* 34:315–326.
- Grivennikov SI, Wang K, Mucida D, Stewart CA, Schnabl B, Jauch D, Taniguchi K, Yu G, Osterreicher CH, Hung KE, Datz C, Feng Y, Fearon ER, Oukka M, Tessarollo L, Coppola V, Yarovsky F, Cheroutre H, Eckmann L, Trinchieri G, Karin M. 2012. Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature* 491:254–258.

- Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 20:621–667.
- Gulubova MV, Ananiev JR, Vlaykova TI, Yovchev Y, Tsoneva V, Manolova IM. 2012. Role of dendritic cells in progression and clinical outcome of colon cancer. *Int J Cancer* 27:159–169.
- Hand TW, Kaech SM. 2009. Intrinsic and extrinsic control of effector T cell survival and memory T cell development. *Immunol Res* 45:46–61.
- Hänsel A, Gunther C, Baran W, Bidier M, Lorenz HM, Schmitz M, Bachmann M, Dobel T, Enk AH, Schäkel K. 2013. Human 6-sulfo LacNAc (slan) dendritic cells have molecular and functional features of an important pro-inflammatory cell type in lupus erythematosus. *J Autoimmun* 40:1–8.
- Hänsel A, Gunther C, Ingwersen J, Starke J, Schmitz M, Bachmann M, Meurer M, Rieber EP, Schäkel K. 2011. Human slan (6-sulfo LacNAc) dendritic cells are inflammatory dermal dendritic cells in psoriasis and drive strong TH17/TH1 T-cell responses. *J Allergy Clin Immunol* 127:787-94.e1-9.
- Hehlgans T, Pfeffer K. 2005. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 115:1–20.
- Helbling M, Lukesch A, Haimovici A, Karamitopoulou E, Berger MD, Hadrich M, Mallaev M, Schnuriger B, Koelzer VH, Dawson H, Borner M, Langer R, Rosenberg R, Nitsche U, Inderbitzin D, Lugli A, Tschan M, Zlobec I. 2014. Investigation of IL-23 (p19, p40) and IL-23R identifies nuclear expression of IL-23 p19 as a favorable prognostic factor in colorectal cancer: a retrospective multicenter study of 675 patients. *Oncotarget* 5:4671–4682.
- Herold G (Hrsg). 2015. Innere Medizin 2015. Selbstverl., Köln.
- Hewitson P, Glasziou P, Watson E, Towler B, Irwig L. 2008. Cochrane Systematic Review of Colorectal Cancer Screening Using the Fecal Occult Blood Test (Hemoccult): An Update. *Am J Gastroenterol* 103:1541.
- Hivroz C, Chemin K, Turret M, Bohineust A. 2012. Crosstalk between T lymphocytes and dendritic cells. *Crit Rev Immunol* 32:139–155.
- Huang A, Gilmour JW, Imami N, Amjadi P, Henderson DC, Allen-Mersh TG. 2003. Increased serum transforming growth factor-beta1 in human colorectal cancer correlates with reduced circulating dendritic cells and increased colonic Langerhans cell infiltration. *Clin Exp Immunol* 134:270–278.
- Hue S, Ahern P, Buonocore S, Kullberg MC, Cua DJ, McKenzie BS, Powrie F, Maloy KJ. 2006. Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *J Exp Med* 203:2473–2483.
- Hung K, Hayashi R, Lafond-Walker A, Lowenstein C, Pardoll D, Levitsky H. 1998. The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med* 188:2357–2368.
- Iwakura Y, Ishigame H. 2006. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest* 116:1218–1222.
- Iwasaki A, Medzhitov R. 2015. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol* 16:343.
- Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. 2010. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology* 138:2044–2058.
- Jensen PE. 2007. Recent advances in antigen processing and presentation. *Nat Immunol* 8:1041.

- Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. 2012. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 12:557.
- Karthaus N, Torensma R, Tel J. 2012. Deciphering the message broadcast by tumor-infiltrating dendritic cells. *Am J Pathol* 181:733–742.
- Keir ME, Sharpe AH. 2005. The B7/CD28 costimulatory family in autoimmunity. *Immunol Rev* 204:128–143.
- Kim R, Emi M, Tanabe K. 2007. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 121:1–14.
- Kortylewski M, Xin H, Kujawski M, Lee H, Liu Y, Harris T, Drake C, Pardoll D, Yu H. 2009. Regulation of the IL-23 and IL-12 balance by Stat3 signaling in the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 15:114–123.
- Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD, Mosconi S, Mandalà M, Cervantes A, Arnold D. 2013. Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 24 Suppl 6:vi64–72.
- Lan F, Le Z, Wu J, Zhang J, Zhang S, Li K, Qi Y, Lin P. 2011. IL-23/IL-23R: potential mediator of intestinal tumor progression from adenomatous polyps to colorectal carcinoma. *Int J Colorectal Dis* 26:1511–1518.
- Lande R, Gilliet M. 2010. Plasmacytoid dendritic cells: key players in the initiation and regulation of immune responses. *Ann N Y Acad Sci* 1183:89–103.
- Langowski JL, Zhang X, Wu L, Mattson JD, Chen T, Smith K, Basham B, McClanahan T, Kastelein RA, Oft M. 2006. IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature* 442:461–465.
- Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201:233–240.
- Le Z, Li J, Li L, Zhang J, Wang X, Yang C, Li Y, Lan F, Lin P. 2014. IL-23 selectively promotes the metastasis of colorectal carcinoma cells with impaired Socs3 expression via the STAT5 pathway. *Carcinogenesis* 35:1330–1340.
- Lechmann M, Berchtold S, Hauber J, Steinkasserer A. 2002. CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation. *Trends Immunol* 23:273–275.
- Legitimo A, Consolini R, Failli A, Orsini G, Spisni R. 2014. Dendritic cell defects in the colorectal cancer. *Hum Vaccin Immunother*. 10:3224–3235.
- Leone P, Shin E, Perosa F, Vacca A, Dammacco F, Racanelli V. 2013. MHC class I antigen processing and presenting machinery: organization, function, and defects in tumor cells. *J Natl Cancer Inst* 105:1172–1187.
- Lesterhuis WJ, Vries IJM de, Schreibelt G, Schuurhuis DH, Aarntzen EH, Boer A de, Scharenborg NM, van de Rakt M, Hesselink EJ, Figdor CG, Adema GJ, Punt CJA. 2010. Immunogenicity of dendritic cells pulsed with CEA peptide or transfected with CEA mRNA for vaccination of colorectal cancer patients. *Anticancer Res* 30:5091–5097.
- Lesterhuis WJ, Vries IJM de, Schuurhuis DH, Boullart ACI, Jacobs JFM, Boer AJ de, Scharenborg NM, Brouwer HMH, van de Rakt M, Figdor CG, Ruers TJ, Adema GJ, Punt CJA. 2006. Vaccination of colorectal cancer patients with CEA-loaded dendritic cells: antigen-specific T cell responses in DTH skin tests. *Ann Oncol* 17:974–980.
- Leung J, Suh W. 2014. The CD28-B7 Family in Anti-Tumor Immunity: Emerging Concepts in Cancer Immunotherapy. *Immune Netw* 14:265–276.
- Liu J, Duan Y, Cheng X, Chen X, Xie W, Long H, Lin Z, Zhu B. 2011. IL-17 is associated with poor prognosis and promotes angiogenesis via stimulating VEGF production of cancer cells in colorectal carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 407:348–354.

- Ljubic B, Radosavljevic G, Jovanovic I, Pavlovic S, Zdravkovic N, Milovanovic M, Acimovic L, Knezevic M, Bankovic D, Zdravkovic D, Arsenijevic N. 2010. Elevated serum level of IL-23 correlates with expression of VEGF in human colorectal carcinoma. *Arch Med Res* 41:182–189.
- Long EO. 2002. Tumor cell recognition by natural killer cells. *Semin Cancer Biol* 12:57–61.
- Ma Y, Shurin GV, Peiyuan Z, Shurin MR. 2013. Dendritic cells in the cancer microenvironment. *Journal of Cancer* 4:36–44.
- MacDonald KPA, Munster DJ, Clark GJ, Dzionek A, Schmitz J, Hart DNJ. 2002. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* 100:4512–4520.
- Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. 2008. Cancer-related inflammation. *Nature* 454:436–444.
- Manz MG, Traver D, Akashi K, Merad M, Miyamoto T, Engleman EG, Weissman IL. 2001. Dendritic Cell Development from Common Myeloid Progenitors. *Ann N Y Acad Sci* 938:167–174.
- Markman JL, Shiao SL. 2015. Impact of the immune system and immunotherapy in colorectal cancer. *J Gastrointest Oncol* 6:208–223.
- McGovern N, Chan JKY, Ginhoux F. 2015. Dendritic cells in humans--from fetus to adult. *Int Immunol* 27:65–72.
- McMullen TPW, Lai R, Dabbagh L, Wallace TM, Gara CJ de. 2010. Survival in rectal cancer is predicted by T cell infiltration of tumour-associated lymphoid nodules. *Clin Exp Immunol* 161:81–88.
- Mellman I. 2013. Dendritic cells: master regulators of the immune response. *Cancer Immunol Res* 1:145–149.
- Mellman I, Coukos G, Dranoff G. 2011. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 480:480–489.
- Michielsen AJ, Noonan S, Martin P, Tosetto M, Marry J, Biniecka M, Maguire AA, Hyland JM, Sheahan KD, O'Donoghue DP, Mulcahy HE, Fennelly D, Ryan EJ, O'Sullivan JN. 2012. Inhibition of dendritic cell maturation by the tumor microenvironment correlates with the survival of colorectal cancer patients following bevacizumab treatment. *Mol Cancer Ther* 11:1829–1837.
- Moretta A. 2005. The dialogue between human natural killer cells and dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 17:306–311.
- Müller U, Steinhoff U, Reis LF, Hemmi S, Pavlovic J, Zinkernagel RM, Aguet M. 1994. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 264:1918–1921.
- Murphy KM, Travers P, Walport M, Janeway C, Ehrenstein M. 2014. *Janeway - Immunologie*. 7. Aufl., korr. Nachdr. Springer Spektrum, Berlin.
- Nace G, Evankovich J, Eid R, Tsung A. 2012. Dendritic cells and damage-associated molecular patterns: endogenous danger signals linking innate and adaptive immunity. *J Innate Immun* 4:6–15.
- Nagorsen D, Voigt S, Berg E, Stein H, Thiel E, Loddenkemper C. 2007. Tumor-infiltrating macrophages and dendritic cells in human colorectal cancer: relation to local regulatory T cells, systemic T-cell response against tumor-associated antigens and survival. *J Transl Med* 5:62.
- Nakayama Y, Inoue Y, Minagawa N, Katsuki T, Nagashima N, Onitsuka K, Tsurudome Y, Sako T, Hirata K, Nagata N, Itoh H. 2003. Relationships between S-100 protein-positive cells and clinicopathological factors in patients with colorectal cancer. *Anticancer Res* 23:4423–4426.

- Neyt K, Perros F, GeurtsvanKessel CH, Hammad H, Lambrecht BN. 2012. Tertiary lymphoid organs in infection and autoimmunity. *Trends Immunol.* 33:297–305.
- Numasaki M, Fukushi J, Ono M, Narula SK, Zavodny PJ, Kudo T, Robbins PD, Tahara H, Lotze MT. 2003. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood* 101:2620–2627.
- Orsini G, Legitimo A, Failli A, Ferrari P, Nicolini A, Spisni R, Miccoli P, Consolini R. 2013. Defective generation and maturation of dendritic cells from monocytes in colorectal cancer patients during the course of disease. *Int J Mol Sci* 14:22022–22041.
- Orsini G, Legitimo A, Failli A, Ferrari P, Nicolini A, Spisni R, Miccoli P, Consolini R. 2014. Quantification of blood dendritic cells in colorectal cancer patients during the course of disease. *Pathol Oncol Res* 20:267–276.
- Ortaldo JR, Mantovani A, Hobbs D, Rubinstein M, Pestka S, Herberman RB. 1983. Effects of several species of human leukocyte interferon on cytotoxic activity of NK cells and monocytes. *Int J Cancer* 31:285–289.
- Pages F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molitor R, Mlecnik B, Kirilovsky A, Nilsson M, Damotte D, Meatchi T, Bruneval P, Cugnenc P, Trajanoski Z, Fridman WH, Galon J. 2005. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* 353:2654–2666.
- Pages F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G, Lagorce C, Wind P, Marliot F, Bruneval P, Zatloukal K, Trajanoski Z, Berger A, Fridman WH, Galon J. 2009. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol* 27:5944–5951.
- Palucka K, Banchereau J. 2012. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer* 12:265–277.
- Palucka K, Banchereau J. 2013. Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines. *Immunity* 39:38–48.
- Palucka K, Ueno H, Fay J, Banchereau J. 2011. Dendritic cells and immunity against cancer. *J Intern Med* 269:64–73.
- Paradowska-Gorycka A, Grzybowska-Kowalczyk A, Wojtecka-Lukasik E, Maslinski S. 2010. IL-23 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol* 71:134–145.
- Perez L, Shurin MR, Collins B, Kogan D, Tourkova IL, Shurin GV. 2005. Comparative analysis of CD1a, S-100, CD83, and CD11c human dendritic cells in normal, premalignant, and malignant tissues. *Histol Histopathol* 20:1165–1172.
- Pernot S, Terme M, Voron T, Colussi O, Marcheteau E, Tartour E, Taieb J. 2014. Colorectal cancer and immunity: what we know and perspectives. *World J Gastroenterol* 20:3738–3750.
- Pfeffer K. 2003. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14:185–191.
- Piccioli D, Tavarini S, Borgogni E, Steri V, Nuti S, Sammiceli C, Bardelli M, Montagna D, Locatelli F, Wack A. 2007. Functional specialization of human circulating CD16 and CD1c myeloid dendritic-cell subsets. *Blood* 109:5371–5379.
- Popat S, Hubner R, Houlston RS. 2005. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol* 23:609–618.
- Popivanova BK, Kitamura K, Wu Y, Kondo T, Kagaya T, Kaneko S, Oshima M, Fujii C, Mukaida N. 2008. Blocking TNF- α in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. *J Clin Invest* 118:560–570.
- Powell JD. 2006. The induction and maintenance of T cell anergy. *Clin Immunol* 120:239–246.

- Pox C, Aretz S, Bischoff SC, Graeven U, Hass M, Heußner P, Hohenberger W. 2014. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 1.1 [Aktualisiert am: August 2014, Aufruf am 05.06.2016]. URL: <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>.
- Pryczynicz A, Cepowicz D, Zareba K, Gryko M, Holody-Zareba J, Kedra B, Kemona A, Guzinska-Ustymowicz K. 2016. Dysfunctions in the Mature Dendritic Cells Are Associated with the Presence of Metastases of Colorectal Cancer in the Surrounding Lymph Nodes. *Gastroenterol Res Pract* 2016:2405437.
- Qaseem A, Denberg TD, Hopkins RH, Humphrey LL, Levine J, Sweet DE, Shekelle P. 2012. Screening for colorectal cancer: a guidance statement from the American College of Physicians. *Ann Intern Med* 156:378–386.
- Quezada SA, Simpson TR, Peggs KS, Merghoub T, Vider J, Fan X, Blasberg R, Yagita H, Muranski P, Antony PA, Restifo NP, Allison JP. 2010. Tumor-reactive CD4+ T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *J Exp Med* 207:637–650.
- Reiner SL. 2007. Development in motion: helper T cells at work. *Cell* 129:33–36.
- Reis e Sousa C. 2004. Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 16:21–25.
- Reis e Sousa C. 2006. Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* 6:476–483.
- Remark R, Alifano M, Cremer I, Lupo A, Dieu-Nosjean MC, Riquet M, Crozet L, Ouakrim H, Goc J, Cazes A, Flejou JF, Gibault L, Verkarre V, Regnard JF, Pages ON, Oudard S, Mlecnik B, Sautès-Fridman C, Fridman WH, Damotte D. 2013. Characteristics and clinical impacts of the immune environments in colorectal and renal cell carcinoma lung metastases: influence of tumor origin. *Clin Cancer Res* 19:4079–4091.
- Rescigno M, Rotta G, Valzasina B, Ricciardi-Castagnoli P. 2001. Dendritic cells shuttle microbes across gut epithelial monolayers. *Immunobiology* 204:572–581.
- Sabatté J, Maggini J, Nahmod K, Amaral MM, Martinez D, Salamone G, Ceballos A, Giordano M, Vermeulen M, Geffner J. 2007. Interplay of pathogens, cytokines and other stress signals in the regulation of dendritic cell function. *Cytokine Growth Factor Rev* 18:5–17.
- Saint-Vis B de, Vincent J, Vandenabeele S, Vanbervliet B, Pin JJ, Ait-Yahia S, Patel S, Mattei MG, Banchereau J, Zurawski S, Davoust J, Caux C, Lebecque S. 1998. A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment. *Immunity* 9:325–336.
- Salama P, Phillips M, Grieco F, Morris M, Zeps N, Joseph D, Platell C, Iacopetta B. 2009. Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 27:186–192.
- Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. 2004. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 22:745–763.
- Salvador A, Igartua M, Luis J, Maria R. 2012. Dendritic Cells Interactions with the Immune System – Implications for Vaccine Development. In: Gowder S (Hrsg) *Cell Interaction*. InTech.
- Sandel MH, Dadabayev AR, Menon AG, Morreau H, Melief CJM, Offringa R, van der Burg, Sjoerd H, Janssen-van Rhijn CM, Ensink NG, Tollenaar RAEM, van de Velde, Cornelis J H, Kuppen PJK. 2005. Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells in colorectal cancer: role of maturation status and intratumoral localization. *Clin Cancer Res* 11:2576–2582.
- Schäkel K. 2009. Dendritic cells--why can they help and hurt us. *Exp Dermatol* 18:264–273.

- Schäkel K, Kannagi R, Kniep B, Goto Y, Mitsuoka C, Zwirner J, Soruri A, Kietzell M von, Rieber E. 2002. 6-Sulfo LacNAc, a novel carbohydrate modification of PSGL-1, defines an inflammatory type of human dendritic cells. *Immunity* 17:289–301.
- Schäkel K, Kietzell M von, Hänsel A, Ebling A, Schulze L, Haase M, Semmler C, Sarfati M, Barclay AN, Randolph GJ, Meurer M, Rieber EP. 2006. Human 6-sulfo LacNAc-expressing dendritic cells are principal producers of early interleukin-12 and are controlled by erythrocytes. *Immunity* 24:767–777.
- Schäkel K, Mayer E, Federle C, Schmitz M, Riethmüller G, Rieber EP. 1998. A novel dendritic cell population in human blood: one-step immunomagnetic isolation by a specific mAb (M-DC8) and in vitro priming of cytotoxic T lymphocytes. *Eur J Immunol* 28:4084–4093.
- Schmitz M, Zhao S, Deuse Y, Schäkel K, Wehner R, Wohner H, Holig K, Wienforth F, Kiessling A, Bornhauser M, Temme A, Rieger MA, Weigle B, Bachmann M, Rieber EP. 2005. Tumoridal potential of native blood dendritic cells: direct tumor cell killing and activation of NK cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 174:4127–4134.
- Schmitz M, Zhao S, Schäkel K, Bornhauser M, Ockert D, Rieber EP. 2002. Native human blood dendritic cells as potent effectors in antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Blood* 100:1502–1504.
- Schrama D, Straten PT, Fischer WH, McLellan AD, Bröcker E, Reisfeld RA, Becker JC. 2001. Targeting of Lymphotoxin- α to the Tumor Elicits an Efficient Immune Response Associated with Induction of Peripheral Lymphoid-like Tissue. *Immunity* 14:111–121.
- Schrama D, Voigt H, Eggert AO, Xiang R, Zhou H, Schumacher TNM, Andersen MH, Straten PT, Reisfeld RA, Becker JC. 2007. Immunological tumor destruction in a murine melanoma model by targeted LT α independent of secondary lymphoid tissue. *Cancer Immunol Immunother* 57:85–95.
- Schreibelt G, Tel J, Sliepen, Kwinten H E W J, Benitez-Ribas D, Figdor CG, Adema GJ, Vries IJM de. 2010. Toll-like receptor expression and function in human dendritic cell subsets: implications for dendritic cell-based anti-cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 59:1573–1582.
- Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. 2011. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331:1565–1570.
- Schwaab T, Weiss JE, Schned AR, Barth RJ. 2001. Dendritic cell infiltration in colon cancer. *J Immunother* 24:130–137.
- Schwitalle Y, Kloor M, Eiermann S, Linnebacher M, Kienle P, Knaebel HP, Tariverdian M, Benner A, Knebel Doeberitz M von. 2008. Immune response against frameshift-induced neopeptides in HNPCC patients and healthy HNPCC mutation carriers. *Gastroenterology* 134:988–997.
- Seliger B, Quandt D. 2012. The expression, function, and clinical relevance of B7 family members in cancer. *Cancer Immunol Immunother* 61:1327–1341.
- Siegel FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ. 1999. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284:1835–1837.
- Siegel R, DeSantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, Cooper D, Gansler T, Lerro C, Fedewa S, Lin C, Leach C, Cannady RS, Cho H, Scoppa S, Hachey M, Kirch R, Jemal A, Ward E. 2012. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 62:220–241.
- Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C (Hrsg). 2010. TNM classification of malignant tumours. 7. Aufl. Wiley-Blackwell, Chichester.
- Sommer U, Larsson B, Tuve S, Wehner R, Zimmermann N, Kramer M, Klobeta A, Gunther C, Babatz J, Schmelz R, Bruckner S, Schetelig J, Bornhauser M, Schäkel K, Bachmann MP,

- Aust D, Baretton G, Schmitz M. 2014. Proinflammatory human 6-sulfo LacNAc-positive dendritic cells accumulate in intestinal acute graft-versus-host disease. *Haematologica* 99:e86-9.
- Steinman RM, Banchereau J. 2007. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 449:419–426.
- Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 21:685–711.
- Stolte M, Eidt S. 1989. Lymphoid follicles in antral mucosa: immune response to *Campylobacter pylori*? *J Clin Path* 42:1269–1271.
- Strioga M, Schijns V, Powell DJ, Pasukoniene V, Dobrovolskiene N, Michalek J. 2013. Dendritic cells and their role in tumor immunosurveillance. *Innate Immun* 19:98–111.
- Suzuki A, Masuda A, Nagata H, Kameoka S, Kikawada Y, Yamakawa M, Kasajima T. 2002. Mature dendritic cells make clusters with T cells in the invasive margin of colorectal carcinoma. *J Pathol* 196:37–43.
- Suzuki H, Ogawa H, Miura K, Haneda S, Watanabe K, Ohnuma S, Sasaki H, Sase T, Kimura S, Kajiura T, Komura T, Toshima M, Matsuda Y, Shibata C, Sasaki I. 2012. IL-23 directly enhances the proliferative and invasive activities of colorectal carcinoma. *Oncol Lett* 4:199–204.
- Szlosarek P, Charles KA, Balkwill FR. 2006. Tumour necrosis factor- α as a tumour promoter. *Eur J Cancer* 42:745–750.
- Takemura S, Braun A, Crowson C, Kurtin PJ, Cofield RH, O'Fallon WM, Goronzy JJ, Weyand CM. 2001. Lymphoid neogenesis in rheumatoid synovitis. *J Immunol* 167:1072–1080.
- Tel J, Anguille S, Waterborg CEJ, Smits EL, Figdor CG, Vries IJM de. 2014. Tumoricidal activity of human dendritic cells. *Trends Immunol* 35:38–46.
- Terzic J, Grivennikov S, Karin E, Karin M. 2010. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology* 138:2101-2114.e5.
- Thaunat O, Field A, Dai J, Louedec L, Patey N, Bloch M, Mandet C, Belair M, Bruneval P, Meilhac O, Bellon B, Joly E, Michel J, Nicoletti A. 2005. Lymphoid neogenesis in chronic rejection: evidence for a local humoral alloimmune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:14723–14728.
- Thomas K, Dietze K, Wehner R, Metz I, Tumani H, Schultheiss T, Gunther C, Schäkel K, Reichmann H, Bruck W, Schmitz M, Ziemssen T. 2014. Accumulation and therapeutic modulation of 6-sulfo LacNAc(+) dendritic cells in multiple sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 1:e33.
- Thomas K, Metz I, Tumani H, Bruck W, Ziemssen T. 2016. 6-sulfo LacNAc dendritic cells accumulate in various inflammatory, but not ischemic conditions of the central nervous system. *Neuropathol Appl Neurobiol* (im Druck) DOI: 10.1111/nan.12313.
- Toma M, Wehner R, Klotz A, Hübner L, Fodelianaki G, Erdmann K, Füssel S, Zastrow S, Meinhardt M, Seliger B, Brech D, Noessner E, Tonn T, Schäkel K, Bornhäuser M, Bachmann M, Wirth M, Baretton G, Schmitz M. 2015. Accumulation of tolerogenic human 6-sulfo LacNAc+ dendritic cells in renal cell carcinoma is associated with poor prognosis. *Oncoimmunology* 4:e1008342.
- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. 2015. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 65:87–108.
- Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, Fredriksen T, Mauger S, Bindea G, Berger A, Bruneval P, Fridman WH, Pages F, Galon J. 2011. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 71:1263–1271.

- Tran Janco JM, Lamichhane P, Karyampudi L, Knutson KL. 2015. Tumor-infiltrating dendritic cells in cancer pathogenesis. *J Immunol* 194:2985–2991.
- Trapani JA, Smyth MJ. 2002. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2:735–747.
- van Cutsem E, Cervantes A, Nordlinger B, Arnold D. 2014. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 25 Suppl 3:iii1-9.
- Vermi W, Micheletti A, Lonardi S, Costantini C, Calzetti F, Nascimbeni R, Bugatti M, Codazzi M, Pinter PC, Schäkel K, Tamassia N, Cassatella MA. 2014. slanDCs selectively accumulate in carcinoma-draining lymph nodes and marginate metastatic cells. *Nat Commun* 5:3029.
- Vermi W, Soncini M, Melocchi L, Sozzani S, Facchetti F. 2011. Plasmacytoid dendritic cells and cancer. *J Leukoc Biol* 90:681–690.
- Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. 2011. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol* 29:235–271.
- Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. 2008. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 9:503–510.
- Walsh KP, Mills KHG. 2013. Dendritic cells and other innate determinants of T helper cell polarisation. *Trends Immunol* 34:521–530.
- Wang K, Karin M. 2015a. The IL-23 to IL-17 cascade inflammation-related cancers. *Clin Exp Rheumatol* 33:S87-90.
- Wang K, Karin M. 2015b. Tumor-Elicited Inflammation and Colorectal Cancer. *Adv Cancer Res* 128:173–196.
- Wang K, Kim MK, Di Caro G, Wong J, Shalapour S, Wan J, Zhang W, Zhong Z, Sanchez-Lopez E, Wu L, Taniguchi K, Feng Y, Fearon E, Grivennikov SI, Karin M. 2014. Interleukin-17 receptor a signaling in transformed enterocytes promotes early colorectal tumorigenesis. *Immunity* 41:1052–1063.
- Waters JP, Poher JS, Bradley JR. 2013a. Tumour necrosis factor and cancer. *J Pathol* 230:241–248.
- Waters JP, Poher JS, Bradley JR. 2013b. Tumour necrosis factor in infectious disease. *J Pathol* 230:132–147.
- Wehner R, Dietze K, Bachmann M, Schmitz M. 2011. The bidirectional crosstalk between human dendritic cells and natural killer cells. *J Innate Immun* 3:258–263.
- Wehner R, Löbel B, Bornhauser M, Schäkel K, Cartellieri M, Bachmann M, Rieber EP, Schmitz M. 2009. Reciprocal activating interaction between 6-sulfo LacNAc⁺ dendritic cells and NK cells. *Int J Cancer* 124:358–366.
- Weigelin B, Krause M, Friedl P. 2011. Cytotoxic T lymphocyte migration and effector function in the tumor microenvironment. *Immunol Lett* 138:19–21.
- Whiteside TL. 2009. Tricks tumors use to escape from immune control. *Oral Oncol* 45:e119-23.
- Yuan A, Steigen SE, Goll R, Vonen B, Husbek A, Cui G, Florholmen J. 2008. Dendritic cell infiltration pattern along the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *APMIS* 116:445–456.
- Zhou LJ, Tedder TF. 1995. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol* 154:3821–3835.
- Zhu J, Paul WE. 2008. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 112:1557–1569.

Anlage 1

**Technische Universität Dresden
Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus
Promotionsordnung vom 24. Juli 2011**

Erklärungen zur Eröffnung des Promotionsverfahrens

1. Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

2. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Professor Dr. Marc Schmitz, Dr. Rebekka Wehner, Dr. Ulrich Sommer, Bärbel Löbel, Katharina Flecke, Maria Rappoport

3. Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

4. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

5. Die Inhalte dieser Dissertation wurden in folgender Form veröffentlicht:

6. Ich bestätige, dass es keine zurückliegenden erfolglosen Promotionsverfahren gab.

Bisher gab es keine zurückliegenden erfolglosen Promotionsverfahren.

7. Ich bestätige, dass ich die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden anerkenne.

8. Ich habe die Zitierrichtlinien für Dissertationen an der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden zur Kenntnis genommen und befolgt.

Dresden, den 15.11.2016

Unterschrift der Doktorandin

Anlage 2

Hiermit bestätige ich die Einhaltung der folgenden aktuellen gesetzlichen Vorgaben im Rahmen meiner Dissertation

- ☒ das zustimmende Votum der Ethikkommission bei Klinischen Studien, epidemiologischen Untersuchungen mit Personenbezug oder Sachverhalten, die das Medizinproduktegesetz betreffen
Aktenzeichen der zuständigen Ethikkommission: EK59032007 (06.03.2007; "Feingewebliche, immunhistologische und molekularpathologische Untersuchungen in langzeit-archiviertem Gewebsmaterial des Institutes für Pathologie des Universitätsklinikums Dresden")
- ☐ die Einhaltung der Bestimmungen des Tierschutzgesetzes
Aktenzeichen der Genehmigungsbehörde zum Vorhaben/zur Mitwirkung: entfällt
- ☐ die Einhaltung des Gentechnikgesetzes
Projektnummer: entfällt
- ☒ die Einhaltung von Datenschutzbestimmungen der Medizinischen Fakultät und des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus.

Dresden, den 15.11.2016

Unterschrift der Doktorandin

Danksagung

An dieser Stelle ist der Zeitpunkt gekommen, um mich bei allen zu bedanken, die mich in den letzten Jahren im Entstehungsprozess dieser Dissertation unterstützt haben.

Zuallererst gebührt mein besonderer Dank Professor Dr. Marc Schmitz für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die Möglichkeit ein derart spannendes Thema zu bearbeiten. Die gesamte Zeit über stand er mir als Ansprechpartner für Fragen und Probleme jeder Art und mit offener und konstruktiver Kritik zur Seite, immer motiviert die bestmögliche Lösung zu finden. Ich hätte mir keine bessere Betreuung vorstellen können. Vielen Dank für die viele aufgewendete Zeit und Geduld.

Mein Dank gilt auch Dr. Rebekka Wehner für ihre vielseitige fachliche, wie auch emotionale Unterstützung. Sie hatte stets ein offenes Ohr für mich und ein Talent meine Elefanten in Mücken zu verwandeln. Ich hoffe wir fahren auch in diesem Jahr zur Weihnachtszeit wieder Riesenrad auf dem Altmarkt.

Bei Prof. Dr. med. Gustavo Baretton, Dr. med. Daniela Aust und Dr. Ulrich Sommer bedanke ich mich für die Bereitstellung der Kolonkarzinom-Gewebeproben und ihr Interesse für dieses Projekt. Dr. Ulrich Sommer danke ich zudem für das Einscannen der immunhistochemisch gefärbten Objektträger, für die kritische Beurteilung meiner Abbildungen und seine Hilfe und Beratung bei pathologischen Fragestellungen.

Für die vielen unterhaltsamen Stunden und den erleichterten Einstieg in die Welt der Pipetten, Verdünnungen und Objektträger danke ich herzlich Maria Rappoport. Gern denke ich an die gemeinsame Zeit zurück. Katharina Flecke möchte ich an dieser Stelle Danke sagen für ihre Hilfe bei der Einarbeitung in die Auswertung der gefärbten Präparate und ihre Erläuterungen zur Bedienung des Fluoreszenzmikroskops.

Allen anderen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der AG Schmitz gebührt auch mein Dank, vornehmlich Karin Günther, Antje Tunger und Anja Kloß. Ihr hab dafür gesorgt, dass ich mich von Anfang an im Institut für Immunologie Willkommen gefühlt habe. Bärbel Löbel möchte ich dabei besonders hervorheben für den freundlichen Empfang in der Arbeitsgruppe und reichlich exzellente technische Einweisung und Hilfestellung.

Herzlicher Dank gebührt selbstverständlich meiner liebevollen Familie und all meinen wunderbaren Freunden, die mich allzu oft inspiriert, motiviert und wenn nötig aufgebaut haben. Besonderer Dank gilt dabei Agnes Geyer, Matthias Geyer und Uwe Geyer für das sorgfältige Korrekturlesen meiner Arbeit auf hartnäckige kleine Fehler. Sie waren in allen Situationen für mich da und haben für Abwechslung abseits von Labor und Schreibtisch gesorgt.

Mein liebender und fürsorglicher Partner Frank Epperlein steht nun am Ende dieser langen Aufzählung und verdient meinen größten Dank. Er ist derjenige, der jede meiner Launen ertragen musste und mich durch alle Höhen und Tiefen im Entstehungsprozess dieser Dissertation begleitet hat. Danke, dass Du so an mich geglaubt und so viel Verständnis aufgebracht hast, obwohl ich oft viel zu wenig Zeit für Dich hatte.